

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/027151 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 16/18, C12N 15/13, 5/10, A61K 39/395, 39/395, A61P 29/00, 19/02, 37/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09868
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 25 日 (25.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-290700 2001 年 9 月 25 日 (25.09.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社免疫生物研究所 (IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒375-0005 群馬県 藤岡市 中宇東田 1 0 9 1-1 Gunma (JP). 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 上出 利光 (UEDE, Toshimitsu) [JP/JP]; 〒004-0835 北海道 札幌市 清田区真栄 5 条 3 丁目 8-2 Hokkaido (JP). 今重之 (KON, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒375-0005 群馬県 藤岡市 中宇東田 1 0 9 1-1 株式会社免疫生物研究所内 Gunma (JP). 山本 宣哉 (YAMAMOTO, Nobuchika) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 樋口 浩文 (HIGUCHI, Hirofumi) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡旭志村 川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 鳥飼 正治 (TORIKAI, Masaharu) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡旭志村 川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 時枝 養之 (TOKIEDA, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡旭志村 川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 中島 敏博 (NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡旭志村 川辺四の西沖 1314-1 財団法人

[続葉有]

(54) Title: RECOMBINANT ANTI-OSTEOPONTIN ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 組換え抗オステオポンチン抗体およびその用途

(57) Abstract: A recombinant antibody in which at least the constant regions in the heavy chain and the light chain have been converted into human-origin regions and which inhibits the binding of an integrin recognizing the RGD sequence to osteopontin or its fragment and inhibits the binding of an integrin recognizing the SVVYGLR sequence or a sequence corresponding thereto to osteopontin or its fragment. This antibody is useful as a remedy for autoimmune diseases and a remedy for rheumatism or rheumatoid arthritis. Thus, a method of treating autoimmune diseases, rheumatism or rheumatoid arthritis is provided. This osteopontin antibody is useful in a diagnostic for rheumatism and a method of diagnosing rheumatism too.

(57) 要約:

重鎖および軽鎖の、少なくとも定常領域がヒト由来のものに変換された抗体であって、RGD配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害し、かつ、SVVYGLR配列またはその相当配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害する組換え抗オステオポンチン抗体が開示されている。この抗体は、自己免疫疾患治療剤、リウマチ治療剤ないしリウマチ性関節炎の治療剤として有用なものであり、自己免疫疾患、リウマチないしはリウマチ性関節炎を治療する方法を提供する。また、このオステオポンチン抗体は、リウマチの診断薬および診断方法にも有用である。



WO 03/027151 A1



化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).
前田 浩明 (MAEDA,Hiroaki) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本
県 菊池郡旭志村 川辺四の西沖1314-1 財団法人化学
及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 小野 信夫, 外(ONO,Nobuo et al.); 〒101-0024
東京都 千代田区 神田和泉町 1-1 3-1 水戸部ビル
4 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,

TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

組換え抗オステオポンチン抗体およびその用途

5 技術分野

本発明は、組換え抗オステオポンチン抗体および該抗体を用いた自己免疫疾患、リウマチおよびリウマチ性関節炎の治療方法に関する。

背景技術

10 オステオポンチン（以下、「OPN」という）は、骨に多く含まれる酸性のカルシウム結合性の糖蛋白質であり、ヒトの場合、mRNAのスプライシング（splicing）の違いから、オステオポンチン-a（以下、「OPN-a」という）、オステオポンチン-b（以下、「OPN-b」という）およびオステオ
15 ポンチン-c（以下、「OPN-c」という）の少なくとも3つのアイソフォームが生じ得ることが知られている。（Y. Saitoh et al., (1995):

Laboratory Investigation, 72, 55-63）このうち、OPN-aの前駆体は、後記配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を持ち、分泌により、シグナルペプチドが切断され、I 17-N 314の成熟体OPN-aがつくられると
20 考えられている。また、成熟体OPNは、生体内のトロンビンにより168番目のアルギニン残基のC末端側で切断されて、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントの2つになる。

上記のOPNは、多種の生理学的病理学的に重要な機能を担っており、例えば、細胞接着、細胞遊走、腫瘍形成、免疫応答および補体が媒介する細胞溶解の阻害等の機能を持っている。この多様な機能は、多種の細胞表面受容体により媒介されている。OPNは、内部にRGD配列をもち（例えば、OPN-aでは、159～161残基目）、このRGD配列を認識する $\alpha V \beta 3$ 、 $\alpha V \beta 1$ および $\alpha V \beta 5$ 等のインテグリンは、OPNの主な受容体であり、このうち、 $\alpha V \beta 3$ 、 $\alpha V \beta 1$ および $\alpha V \beta 5$ インテグリンは、血管の平滑筋細胞におい

て細胞接着を媒介し、更に $\alpha V \beta 3$ は、マクロファージ、リンパ球、内皮細胞および平滑筋細胞等の遊走に関係している。

さらに、これまでの研究から、OPNは、SVVYGLR配列を介して $\alpha 9 \beta 1$ 、 $\alpha 4 \beta 1$ および $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンと結合することも明らかにされているが、これらのうち $\alpha 4 \beta 1$ は、トロンビンで切断されていないOPN（非切断型OPN）とトロンビンで切断されたN末端フラグメント（切断型OPN）の両方に結合し、 $\alpha 9 \beta 1$ はトロンビン切断型OPNにのみ結合するという様式の差も見出されている（Y. Yokosaki et al., (1999): The Journal of Biological Chemistry 274, 36328-36334/P. M. Green et al., (2001): FEBS Letters 503, 75-79/S. T. Barry et al., (2000): Experimental Cell Research 258, 342-351）。これらの $\alpha 9$ 及び $\alpha 4$ 、 $\beta 1$ 及び $\beta 7$ のインテグリンサブユニットは、相互にアミノ酸配列間の類似性が高い。そして、 $\alpha 4 \beta 1$ 及び $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンは、主として、リンパ球と単球で見出されるが、好中球ではごくわずかに発現しているにすぎない。一方、 $\alpha 9 \beta 1$ は、好中球に選択的に高発現しており VCAM-1 や Tenascin-C などを通じて、好中球遊走に必須の機能を担っている。また、筋肉細胞や上皮細胞、肝細胞などで広く発現している。このように、インテグリンサブユニット $\alpha 4$ と $\alpha 9$ の細胞質ドメインは、それぞれ微妙に異なった細胞内シグナル伝達経路を通して、互いに協同して炎症部位への白血球の遊走と凝集を促し、それらの浸潤活性を増強することによって、様々な炎症反応に関与していると考えられる。

このように、様々な種類のインテグリンが、白血球の遊走を促進し、炎症反応に関与していることから、これらのインテグリン活性を阻害する薬剤は、潜在的には抗炎症剤としての可能性を有していると思われる。たとえば、インテグリン $\alpha V \beta 3$ は、破骨細胞、血管内皮細胞および平滑筋細胞等で発現されており、 $\alpha V \beta 3$ インテグリンとその様々な結合リガンドとの結合を阻害することにより、例えば関節では、関節破壊抑制作用が期待できることから、抗 $\alpha V \beta 3$ 抗体の開発が実際に行われている。

しかしながら、インテグリンファミリーに属する受容体は、広範な組織で普

遍的に発現して生命活動維持に必須の機能を担っていることから、リウマチ性関節炎や変形性関節炎の治療にインテグリンに対する抗体を用いると、他の部位でも同様の障害がおこる可能性があり、副作用の発生も懸念される。

5 また、WO 0 1 / 7 1 3 5 8 には $\alpha 4$ インテグリンとオステオポンチンとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法およびスクリーニングで得られた物質を用いた炎症疾患の治療方法等について開示されている。

リウマチ性関節炎の病因としては種々の因子が考えられており、多くの報告があるが確実なものはない。また、その治療法においても、現在知られているものは対症療法的なものであり、必ずしも満足できるものではなかった。

10 従って、リウマチ性関節炎の病因を明確にし、より優れた治療法を提供することが強く求められており、本発明はこのような課題の解決をその目的とするものである。

また、リウマチ性関節炎は、変形性関節症などと判別し難く、このための診断方法の提供も本発明の課題の一つである。

15

本発明者らは、リウマチ患者および変形性関節症患者で、関節腔液のOPN濃度が高値を示すことを知り、さらにリウマチ患者において、全OPNに占めるトロンビン開裂型のN末端フラグメントの割合が増大することを初めて見出し、OPNが、これらの疾患の発症に深く関わっていることに思い至った。そして、OPNのノックアウトマウスを用いた実験によりこの事実を確認した。

20

また、OPNをトロンビンで切断したN末端フラグメント及びC末端フラグメントについて、それぞれのフラグメントを区別して認識する抗体を作成し、それらを用いた試験により、リウマチ性関節炎患者では、特にトロンビンにより切断されたN末端フラグメントが関節腔内で高濃度を示すことを見出した。

25

更に本発明者らは、前述のリウマチ性関節炎患者に高い濃度で見出されるN末端フラグメントには、ヒト型インテグリンが認識するRGD配列とSVVYGLR配列が共に存在していることに着目し、これら両者の配列を同時にブロックする抗体は、OPNとインテグリンの結合を幅広く阻害し、リウマチ性関

節炎や変形性関節炎の治療に効果があるのではないかと予想した。

上記OPNは、腎臓・胎盤・卵巣・脳・皮膚などにも分布するが、主として骨組織に発現している。本発明者らは、リウマチ性関節炎の治療に際して、OPNとインテグリンの結合をOPN側により特異的な方法で遮断することが望ましいと考えた。その際、炎症には前述の多岐に渡るインテグリンが協同的に関与していると考えられるので、これらの多岐に渡るインテグリンとの結合が、より幅広く遮断されることが有効であると考えた。

そこで、ヒトOPNのRGD配列とインテグリンの結合およびヒトOPNのSVVYGLR配列とインテグリンとの結合を阻害する抗体を作成し、細胞接着および細胞遊走等の実験によりその効果を確認した。さらに、マウスOPNの当該内部配列に対応する合成ペプチドに対する抗体を取得し、マウスの関節炎病態モデルを用いて、そのような抗体の治療薬としての効果を調べた。

すなわち、マウスOPNは、ヒトOPNとアミノ酸配列上で相同な位置にマウスのインテグリンによって認識されるRGD配列及びSLAYGLR配列を有しているので、これらの配列を同時にブロックする抗体として、M5抗体を取得した。このM5抗体とマウスOPNおよびそのトロンピン消化物との結合は、RGD配列を含むGRGDSPペプチドで阻害され、またこのM5抗体は、TNF- α で活性化したマウス脾臓由来の単球の遊走を阻害することが確認された。このM5抗体を、マウスのカルバリア (calvaria) 器官培養系で調べてみたところ、骨破壊の抑制作用が観察された。さらに、マウスのコラーゲン関節炎モデルに、上記抗体を投与してみたところ、明らかに治療効果を示すことが確認された。

以上の結果は、RGD配列、SVVYGLR配列とヒト型インテグリンの結合を同時にブロックする抗体が、OPNとインテグリンの結合を阻害し、リウマチ性関節炎等の治療に有効であることを強く示唆しており、さらに、若年性関節リウマチや慢性リウマチ等のリウマチのみならず、乾癬性関節炎や乾癬の治療への効果が期待されることを示している。また、臓器移植後の慢性拒絶は、血管や気管支の閉塞性病変を特徴としているが、その組織学的検討から、T細

胞やマクロファージの活性化がサイトカイン、増殖因子の産生、血管内皮細胞障害を引き起こし、さらに血管平滑筋の増殖が線維化などを引き起こすために血管閉塞へ進展して行くと考えられている (P. Freese et al., (2001): Nephrol Dial Transplant, 16, 2401-2406 / J. R. Waller et al., (2001): British Journal of Surgery, 88, 1429-1441/ S. R. Lehtonen et al., (2001): Transplantation, 72, 1138-1144)。そして、これらのマクロファージの活性化や血管平滑筋の線維化にはOPNが必須の蛋白として機能することが報告されており (A. O'Regan et al., (2000): Int J Exp Pathol, 81, 373-390)、本発明のOPN阻害抗体は、単球や好中球の遊走を抑制することにより、このような線維化に向けての過程を抑制する可能性がある。従って、臓器移植後の慢性拒絶反応を抑制し、臓器生着に寄与し、また、全身性自己免疫疾患、エリテマトーデス、ぶどう膜炎、ベーチェット病、多発性筋炎、糸状体増殖性腎炎、サルコイドーシス等の自己免疫疾患の治療への効果が期待される。

以上の知見に基づき、本出願人らは、RGD配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害し、かつ、SVVYGLR配列またはその相当配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害する抗オステオポンチン抗体を見出し、これについて国際出願 (PCT/JP02/03382) を行った。

発明の開示

上記抗オステオポンチン抗体は、マウス由来の抗体 (以下、「マウス抗体」という) であるが、ヒトのオステオポンチンに対して強い親和性を有することにより、オステオポンチンが持つ末梢血単核球あるいは好中球に対する遊走活性を阻害することができる。これによりこのマウス抗体はヒトのリウマチを始めとする種々の炎症性疾患治療薬としての適用が期待されるが、マウス抗体はマウス由来のものであるため、抗原性の惹起等の安全性および半減期の短縮等の有効性の観点から、ヒトに投与することは現実的には難しいものであった。

そこで本発明者らは、マウス抗体の活性を低下させないまま、遺伝子工学的

手法を用いて上記マウス抗体の改変を行ない、より抗原性の問題の少ないオステオポンチンに対する抗体を得るに到った。

すなわち、本発明は以下に記載の〔１．〕～〔４５．〕の発明を提供するものである。

５ 〔１．〕 RGD配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害し、かつ、SVVYGLR配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害する抗オステオポンチン抗体または当該抗体に起因する抗体断片。

10 〔２．〕 部分アミノ酸配列としてRGDSVVYGLRSを含むペプチドを抗原として得られたものである〔１．〕記載の抗オステオポンチン抗体。

 〔３．〕 ペプチドVDTYDGRGDSVVYGLRSを抗原として得られたものである〔１．〕または〔２．〕記載の抗オステオポンチン抗体。

 〔４．〕 モノクローナル抗体である〔１．〕ないし〔３．〕の何れかに記載の抗オステオポンチン抗体。

15 〔５．〕 キメラ抗体である〔１．〕ないし〔３．〕の何れかに記載の抗オステオポンチン抗体。

 〔６．〕 下記の重鎖（a）および軽鎖（b）を有する〔５．〕記載の抗オステオポンチン抗体。

20 （a）マウス由来の重鎖可変領域およびヒト由来の重鎖定常領域を有する重鎖
 （b）マウス由来の軽鎖可変領域およびヒト由来の軽鎖定常領域を有する軽鎖

 〔７．〕 重鎖（a）のマウス由来の重鎖可変領域が、配列番号１９に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする〔５．〕または〔６．〕記載の抗オステオポンチン抗体。

25 〔８．〕 軽鎖（b）のマウス由来の軽鎖可変領域が、配列番号２０に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする〔５．〕または〔６．〕記載の抗オステオポンチン抗体。

 〔９．〕 重鎖（a）の重鎖定常領域が、ヒトIg γ １である〔５．〕または〔６．〕記載の抗オステオポンチン抗体。

[1 0 .] 軽鎖 (b) の軽鎖定常領域が、ヒト I g κ である [5 .] または [6 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

[1 1 .] ヒト化抗体である [1 .] ないし [3 .] の何れかに記載の抗オステオポンチン抗体。

5 [1 2 .] 下記の重鎖 (c) および軽鎖 (d) を有する [1 1 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

(c) マウス由来の重鎖可変領域の相補性決定領域およびヒト由来の重鎖可変領域のフレームワーク領域を有する重鎖可変領域ならびにヒト由来の重鎖定常領域を有する重鎖

10 (d) マウス由来の軽鎖可変領域の相補性決定領域およびヒト由来の軽鎖可変領域のフレームワーク領域を有する軽鎖可変領域ならびにヒト由来の軽鎖定常領域を有する軽鎖

[1 3 .] 重鎖 (c) のマウス由来の重鎖可変領域の相補性決定領域が、配列番号 2 1 ~ 2 3 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする [1 1 .] または [1 2 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

[1 3 .] 軽鎖 (d) のマウス由来の軽鎖可変領域の相補性決定領域が、配列番号 2 4 ~ 2 6 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする [1 1 .] または [1 2 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

20 [1 5 .] 重鎖 (c) の重鎖可変領域が、配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする [1 1 .] または [1 2 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

[1 6 .] 軽鎖 (d) の軽鎖可変領域が、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする [1 1 .] または [1 2 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

25 [1 7 .] 重鎖 (c) の重鎖定常領域が、ヒト I g γ 1 である [1 1 .] または [1 2 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

[1 8 .] 軽鎖 (d) の軽鎖定常領域が、ヒト I g κ である [1 1 .] または [1 2 .] 記載の抗オステオポンチン抗体。

- [1 9 .] 配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。
- [2 0 .] 配列番号 2 0 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。
- [2 1 .] 配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。
- [2 2 .] 配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。
- 5 [2 3 .] [1 9 .] に記載の塩基配列とヒト I g γ 1 遺伝子とを有するベクター。
- [2 4 .] [2 0 .] に記載の塩基配列とヒト I g κ 遺伝子とを有するベクター。
- [2 5 .] [2 1 .] に記載の塩基配列とヒト I g γ 1 遺伝子とを有するベ
- 10 クター。
- [2 6 .] [2 2 .] に記載の塩基配列とヒト I g κ 遺伝子とを有するベクター。
- [2 7 .] [2 3 .] および [2 4 .] に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
- 15 [2 8 .] [2 5 .] および [2 6 .] に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
- [2 9 .] [5 .] または [6 .] 記載の抗オステオポンチンキメラ抗体の製造方法であって、 [2 7 .] 記載の宿主細胞を培養し、培養液から抗オステオポンチンキメラ抗体を採取することを特徴とする抗オステオポンチンキメラ
- 20 抗体の製造方法。
- [3 0 .] [1 1 .] または [1 2 .] 記載の抗オステオポンチンヒト化抗体の製造方法であって、 [2 8 .] 記載の宿主細胞を培養し、培養液から抗オステオポンチンヒト化抗体を採取することを特徴とする抗オステオポンチンヒト化抗体の製造方法。
- 25 [3 1 .] [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含む自己免疫疾患治療剤。
- [3 2 .] [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の

何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含むリウマチ治療剤。

[3 3 .] [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含む
5 リウマチ性関節炎の治療剤。

[3 4 .] [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含む
変形性関節症の治療剤。

[3 5 .] 自己免疫疾患患者に、[1 .] ないし [6 .] または [1 1 .]
10 もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

[3 6 .] リウマチ患者に、[1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を投与することを特徴とするリウマチ性関節炎の治療方法。

15 [3 7 .] リウマチ性関節炎患者に、[1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を投与することを特徴とするリウマチの治療方法。

[3 8 .] 変形性関節症患者に、[1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片
20 を投与することを特徴とする変形性関節症の治療方法。

[3 9 .] 自己免疫疾患治療剤製造のための [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片の使用。

[4 0 .] リウマチ治療剤製造のための [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片の使用。
25

[4 1 .] リウマチ性関節炎の治療剤製造のための [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に

起因する抗体断片の使用。

[4 2 .] 変形性関節症の治療剤製造のための [1 .] ないし [6 .] または [1 1 .] もしくは [1 2 .] の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片の使用。

5 [4 3 .] 被検化合物の、オステオポンチンの R G D 配列とインテグリンの結合および／または、 S V V Y G L R 配列とインテグリンとの結合の阻害程度を評価することを特徴とする自己免疫疾患治療剤のスクリーニング方法。

[4 4 .] 被検化合物の、オステオポンチンの R G D 配列とインテグリンの結合および／または、 S V V Y G L R 配列とインテグリンとの結合の阻害程度
10 を評価することを特徴とするリウマチ治療剤のスクリーニング方法。

[4 5 .] 被検化合物の、オステオポンチンの R G D 配列とインテグリンの結合および／または、 S V V Y G L R 配列とインテグリンとの結合の阻害程度を評価することを特徴とするリウマチ性関節炎治療剤のスクリーニング方法。

15 図面の簡単な説明

図 1 は、 O P N に対する R G D 依存性細胞接着の阻害を示す図面である。

図 2 は、マウス 2 K 1 抗体による、 α 9 形質転換 S W 4 8 0 細胞と n O P N の R G D 依存性、および R G D 非依存性細胞接着の阻害を示す図面である。

図 3 a は、 O P N - 誘導細胞遊走を示す図面である。

20 図 3 b は、 O P N - 誘導細胞遊走の、抗体による抑制を示す図面である。

図 4 は、 O P N 遺伝子欠損マウスと正常マウスのそれぞれに、関節炎惹起抗体カクテル / L P S を投与した場合の関節炎スコアの経時変化を示す図面である。

図 5 は、 O P N 遺伝子欠損マウスと正常マウスのそれぞれに、関節炎惹起抗
25 体カクテル / L P S を投与した場合の手首の腫れを比較した図面である。

図 6 a は、マウス 2 K 1 抗体をアナライトとした場合の B I A C O R E - 2 0 0 0 のセンサーグラムを示した図面である。

図 6 b は、キメラ 2 K 1 抗体をアナライトとした場合の B I A C O R E - 2

0 0 0 のセンサーグラムを示した図面である。

図 7 は、マウス 2 K 1 抗体と鋳型ヒト抗体の V H アミノ酸配列の比較を示した図面である。

5 図 8 は、マウス 2 K 1 抗体と鋳型ヒト抗体の V L アミノ酸配列の比較を示した図面である。

図 9 は、ヒト化 2 K 1 抗体の V H アミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列を示した図面である。

図 1 0 は、ヒト化 2 K 1 抗体の V L アミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列を示した図面である。

10 図 1 1 は、ヒト化 2 K 1 抗体の V H 塩基配列を増幅するためのプライマーの設計を示す図面である。

図 1 2 は、ヒト化 2 K 1 抗体の V L 塩基配列を増幅するためのプライマーの設計を示す図面である。

15 図 1 3 は、ヒト化 2 K 1 抗体およびキメラ 2 K 1 抗体の濃度に基づくオステオポンチンペプチドに対する結合活性を示す図面である。

図 1 4 は、マウス O P N と N I H 3 T 3 の濃度依存的な接着を示す図面である。

図 1 5 は、マウス O P N と N I H 3 T 3 の接着を G R G D S P ペプチドが阻害することを示す図面である。

20 図 1 6 は、M 5 抗体によるマウス O P N と N I H 3 T 3 の接着阻害を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明の抗オステオポンチンキメラ抗体および抗オステオポンチンヒト化抗体は、例えば、国際出願（PCT/JP02/03382）に記載の、R G D 配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害し、かつ、S V V Y G L R 配列またはその相当配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害する抗オステオポンチン

マウス抗体（以下、「OPN阻害抗体」という）について、その定常領域を治療対象とするヒトあるいは動物の抗体と同じ定常領域を持つように遺伝子工学的に改変してキメラ抗体（欧州特許公開公報 EP 0 1 2 5 0 2 3 参照）として、ヒト化抗体（欧州特許公開公報 EP 0 2 3 9 4 0 0 または EP 0 4 5 1 2 6 参照）とすることにより得られる。

抗体分子の基本構造は、各クラス共通で、分子量5万～7万の重鎖と2～3万の軽鎖から構成される。重鎖は、通常約440個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、クラスごとに特徴的な構造をもち、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEに対応して γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 鎖とよばれる。さらにIgGには、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4が存在し、それぞれ γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4とよばれている。軽鎖は、通常約220個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなるL型とK型の2種が知られており、それぞれ λ 、 κ 鎖とよばれる。抗体分子の基本構造のペプチド構成は、それぞれ相同な2本の重鎖および2本の軽鎖が、ジスルフィド結合（S-S結合）および非共有結合によって結び合わされており、分子量15万～19万である。2種の軽鎖は、どの重鎖とも対をなすことができる。個々の抗体分子は、常に同一の軽鎖2本と同一の重鎖2本からできている。

鎖内S-S結合は、重鎖に四つ（ μ 、 ϵ 鎖には五つ）、軽鎖には二つあって、アミノ酸100～110残基ごとに一つのループを成し、この立体構造は各ループ間で類似していて、構造単位あるいはドメインとよばれる。重鎖、軽鎖ともにN末端に位置するドメインは、同種動物の同一クラス（サブクラス）からの標品であっても、そのアミノ酸配列が一定せず、可変領域（V領域、variable region、可変部）とよばれている（各ドメインは、それぞれ、 V_H および V_L と表される。）。これよりC末端側のアミノ酸配列は、各クラスあるいはサブクラスごとにほぼ一定で、定常領域（C領域、constant region、定常部）とよばれている（各ドメインは、それぞれ、 C_H 1、 C_H 2、 C_H 3あるいは C_L と表される。）。

抗体の抗原決定部位は V_H および V_L によって構成され、結合の特異性はこ

の部位のアミノ酸配列によっている。一方、補体や各種細胞との結合といった生物学的活性は各クラス I g の C 部位の構造の差を反映している。軽鎖と重鎖の可変領域の可変性は、どちらの鎖にも存在する 3 つの小さな超可変領域

(hypervariable region) にほぼ限られることがわかっており、これらの領域を相補性決定領域 (CDR、complementarity determining region) と呼んでいる。可変領域の残りの部分はフレームワーク領域 (FR、framework region) とよばれ、比較的一定である。通常、各可変領域の相補性決定領域の 5 ~ 10 個のアミノ酸だけが抗原結合部位を形成している。

抗原と反応する可変領域についてはマウス型を利用し、それ以外の部分をヒト型にしたタンパク質はキメラ抗体とよばれている。ここでは、さらに、オステオポンチンおよびその断片を認識するキメラ抗体を抗オステオポンチンキメラ抗体とよんでいる。さらに、抗原特異的なマウスモノクローナル抗体分子の相補性決定領域 (抗原結合部位) 以外をすべてヒト免疫グロブリン分子のアミノ酸に置き換えた遺伝子組換えタンパク質はヒト化抗体とよばれている。ここでは、さらに、オステオポンチンおよびその断片を認識するヒト化抗体を抗オステオポンチンヒト化抗体とよんでいる。

本発明の抗オステオポンチンキメラ抗体および抗オステオポンチンヒト化抗体作製のために用いられる OPN 阻害抗体は、RGD 配列を認識するインテグリン、例えば $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ 等と OPN-a, OPN-b, OPN-c またはそれらの N 末端フラグメントとの結合を阻害し、かつ、SVVYGLR 配列を認識するインテグリン、例えば $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 7$ 等と OPN-a, OPN-b, OPN-c またはそれらの N 末端フラグメントとの結合を阻害できるものであればどのような抗体でもよい。SVVYGLR 配列またはその相当配列とは、ヒト OPN の 162 番目のセリンから 168 番目のアルギニンまでの配列を指し、その相当配列とは、他の哺乳動物の OPN の SVVYGLR に相当する配列を言い、例えばブタではヒトと同じく SVVYGLR、サルでは SVAYGLR、マウスやラットでは SLAYGLR、ウシでは SVAYGLK、ウサギでは SVAYRLK である。

このOPN阻害抗体は、上記のような性質を保持する抗体であれば、その製法は特に限定されず、例えばOPN-a、OPN-b、OPN-cや、これらのN末端フラグメント、あるいはアミノ酸配列RGDSVVYGLR配列またはその相当配列を含んでいるペプチド（以下、これらを「OPN関連ペプチド」と総称する）を抗原として用いることにより作製できる。なお、こ

5 うOPNのフラグメントとは、OPNがタンパク質分解酵素等により分解されたフラグメントをいい、例えばトロンピンにより分解されたフラグメントをいう。

上記OPN阻害抗体は、好ましくは、RGDSVVYGLR配列を含んでいるペプチドを抗原として用いることにより作製される。より好ましくは、例

10 えばこの両配列を連続して有するOPN-aの153番目バリン残基から169番目セリン残基までのペプチド（VDTYDGRGDSVVYGLRS）を抗原として用い、以下常法に従って処理することによって得ることができる。抗原性を高めるためには、上記OPN関連ペプチドと生体高分子化合物との結

15 合物を抗原として用いることが好ましい。

また、実験動物としてマウスを用い、OPNに関連する疾患等の研究を行う場合は、マウスのOPNに対応するOPN阻害抗体を用いることが望ましく、そのような抗体は、好ましくは、RGDSLAYGLR配列を含んでいるペプチドを抗原として用いることにより作製される。

上記OPN関連ペプチドと結合させる生体高分子化合物の例としては、スカシ貝のヘモシアニン（以下「KLH」という）、卵白アルブミン（以下、「OVA」という）、ウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）、ウサギ血清アルブミン（以下「RSA」という）、サイログロブリン等が挙げられ、このうちKLHおよびサイログロブリンがより好ましい。

20

上記OPN関連ペプチドと生体高分子化合物との結合は、例えば、混合酸無水物法（B. F. Erlanger et al., (1954): J. Biol. Chem., 234, 1090-1094）または活性化エステル法（A. E. Karu et al., (1994): J. Agric. Food Chem., 42, 301-309）等の公知の方法によって行うことができる。

25

混合酸無水物法において用いられる混合酸無水物は、OPN関連ペプチドを通常のショットテンーバウマン反応に付すことにより得られ、これを生体高分子化合物と反応させることにより目的とするペプチドー高分子化合物結合体が作製される。この混合酸無水物法において使用されるハロ蟻酸エステルとしては、
5 例えばクロロ蟻酸メチル、ブromo蟻酸メチル、クロロ蟻酸エチル、ブromo蟻酸エチル、クロロ蟻酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるペプチドとハロ蟻酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

なお、ショットテンーバウマン反応は塩基性化合物の存在下に行われるが、当該反応に用いられる塩基性化合物としては、ショットテンーバウマン反応に慣用の化合物、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、ピリジン、ジメチルアニリン、N-メチルモルホリン、ジアザビスクロノネン（DBN）、ジアザビスクロウンデセン（DBU）、ジアザビスクロオクタン（DABCO）等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基等を使用することができる。
10 15

また上記反応は、通常、-20℃から100℃、好ましくは0℃から50℃において行われ、反応時間は5分から10時間程度、好ましくは5分から2時間である。

得られた混合酸無水物と生体高分子化合物との反応は、通常マイナス20℃から150℃、好ましくは0℃から100℃において行われ、反応時間は5分から10時間程度、好ましくは5分から5時間である。混合酸無水物法は一般に溶媒中で行われるが、溶媒としては、混合酸無水物法に慣用されているいずれの溶媒も使用可能であり、具体的にはジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、N、N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒等が挙げられる。
20 25

一方、活性化エステル法は、一般に以下のように行うことができる。まず、OPN関連ペプチドを有機溶媒に溶解し、カップリング剤の存在下にてN-ヒドロキシコハク酸イミドと反応させ、N-ヒドロキシコハク酸イミド活性化エステルを生成する。

- 5 カップリング剤としては、縮合反応に慣用されている通常のカップリング剤を使用でき、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、水溶性カルボジイミド等が挙げられる。また、有機溶媒としては、例えばN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド、ジオキサン等が使用できる。反応に使用するペプチドとN-ヒドロキシコハク酸イミド等のカップリング剤のモル比は好ましくは1：10～10：1、最も好ましくは1：1である。反応温度は、0～50℃、好ましくは22～27℃で、
10 反応時間は5分～24時間、好ましくは1～2時間である。反応温度は各々の融点以上沸点以下の温度で行うことができる。

- 15 カップリング反応後、反応液を生体高分子化合物を溶解した溶液に加え反応させると、例えば生体高分子化合物が遊離のアミノ基を有する場合、当該アミノ基とペプチドのカルボキシル基の間に酸アミド結合が生成される。反応温度は、0～60℃、好ましくは5～40℃、より好ましくは22～27℃で、反応時間は5分～24時間、好ましくは1～16時間、より好ましくは1～2時間である。

- 20 上記の方法によるOPN関連ペプチドと生体高分子化合物との反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製することにより、OPN関連ペプチドと生体高分子化合物との結合物（以下、単に「結合物」ということがある）を得ることができる。

- 25 次に、上のようにして得られた結合物を抗原として用いる抗体の作製法および当該抗体を用いる免疫化学的測定法について説明する。尚、抗体の調製にあたっては、公知の方法、例えば続生化学実験講座、免疫生化学研究法（日本生化学会編）等に記載の方法を適宜利用することができる。

上記結合物を使用して、本発明のポリクローナル抗体を作製するには、当該

結合物で動物を免疫し、当該動物から抗体を採取すれば良い。

すなわち、まず、例えば、OPN関連ペプチド-サイログロブリン結合物等の結合物をリン酸ナトリウム緩衝液（以下、「PBS」という）に溶解し、これとフロイント完全アジュバントまたはフロイント不完全アジュバント、あるいはミョウバン等の補助剤とを混合したものを、免疫原として用いて、哺乳動物を免疫する。

免疫される動物としては当該分野で常用されるものであればいずれも使用できるが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等を挙げることができる。また、免疫の際の免疫原の投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。免疫は、1回または適当な間隔で複数回、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回、行うことができる。次いで、常法に従い、免疫した動物から血液を採取して、血清を分離し、ポリクローナル抗体画分を精製することにより、OPN阻害抗体を得ることができる。

また、常法に従い、前記結合物で動物を免疫して得た免疫細胞と、ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得、当該ハイブリドーマの培養物から抗体を採取することによってモノクローナル抗体としてOPN阻害抗体を得ることもできる。

上記したモノクローナルOPN阻害抗体または該抗体産製ハイブリドーマを基に、本発明の抗オステオポンチンキメラ抗体や、抗オステオポンチンヒト化抗体の作製は、前記したように、欧州特許公開公報EP0125023、欧州特許公開公報EP0239400、EP045126等を参照することにより行われるが、本発明においては、特に国際公開公報WO94/20632に記載の方法に準じてマウス抗体からキメラ抗体またはヒト化抗体を作製することが望ましい。

例えば、治療の対象がヒトであり、OPN阻害抗体産生動物がマウスの場合には、例えば、マウス抗体の可変領域とヒト抗体定常領域を連結させた抗体（以下、これを「キメラ抗体」という）やマウス抗体の可変領域中の相補性決

定領域を中心にヒト抗体に移植した抗体（以下、これを「ヒト化抗体」という）を用いるのが望ましい。さらには、抗体産生のためにはキメラ抗体遺伝子またはヒト化抗体遺伝子を導入したマウス等のトランスジェニック動物を用いる方法や、ファージディスプレイ（phage display）法を用いることもできる。

5 このようにして得られたOPN阻害抗体はそのまま用いることができるが、当該抗体を構成する重鎖及び／または軽鎖のポリペプチドの少なくとも一部を有し、抗原に対して結合活性を有するポリペプチド鎖から構成されるタンパクとして用いたり、一本鎖抗体（scFv）、FabやF(ab')₂などのOPN阻害抗体に起因する抗体断片のかたちで用いることができる。

10 具体的に、マウス抗体からキメラ抗体を作製するには、まず、マウス抗体の可変領域遺伝子を該抗体産製ハイブリドーマ（例えば本実施例2に記載のハイブリドーマ（FERM BP-7883））より常法によりクローニングし、塩基およびそれによってコードされているアミノ酸配列を決定する。このよう
15 にして決定したマウス抗体の可変領域遺伝子と抗体のリーダー配列等を、ヒト抗体の適当なクラスの定常領域遺伝子、好ましくはIgGクラスの抗体の定常領域遺伝子と連結させてキメラ抗体遺伝子を作製する。

次いで、このキメラ抗体遺伝子を適当な発現ベクターに連結し、培養細胞中に導入する。最後にこの培養細胞を培養して培養上清からキメラ抗体を得ることができる。

20 上記のようにして決定されたマウス抗体の可変領域遺伝子は、対応するマウス抗体のリーダー配列およびJ領域に対するプライマーを用いてPCR法により増幅し、可変領域遺伝子断片として得ることができる。この可変領域遺伝子断片の両端にはクローニングのための制限酵素認識部位を連結するのが好ましい。

25 上記で得られた遺伝子断片とヒト抗体の定常領域遺伝子と連結させてキメラ抗体遺伝子（以下、単に「キメラ抗体遺伝子」という）を作製する。この組み合わせに特別な組み合わせはなく、最終的に抗原との結合活性を発現できる組み合わせであれば、目的に応じてどのようなサブクラスの定常領域（例えば、

重鎖として $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ または $\gamma 4$ 、軽鎖として λ または κ 鎖の定常領域)も選択可能である。また、定常領域の機能を強化あるいは低減させるようにデザインされた定常領域遺伝子との組み合わせでも構わない。

上記のようにして得られたキメラ抗体遺伝子と連結される発現ベクターとしては国際公開公報WO 94/20632に記載のAG- $\gamma 1$ やAG- κ 等の発現ベクターが使用できるが、キメラ抗体遺伝子を発現することができるものであれば特に制限されない。なお、発現ベクターとしてAG- $\gamma 1$ あるいはAG- κ 等の予めIg遺伝子を有するものを利用すれば、これに上記マウス抗体の可変領域遺伝子を挿入するだけでキメラ抗体遺伝子を有する発現ベクターとなるため好ましい。

上記した発現ベクターは、例えばリン酸カルシウム法等により、培養細胞中に導入される。

発現ベクターを導入する培養細胞としては、例えば、CHO-DG44細胞等の培養細胞が使用でき、これを常法により培養すればよい。

上記培養後、培養上清中に蓄積されたキメラ抗体は、例えば、プロテインAカラムを用いた各種クロマトグラフィーにより精製することができる。

こうして得られたキメラ抗体の抗原活性は、例えば、オステオポンチンペプチド等を用いたELISAやBIAcore (BIAcore社)等により測定可能である。

また、本発明においては、例えば以下説明する方法により、上記キメラ抗体よりも、更に、ヒト抗体に近いヒト化抗体を作製することも可能である。

具体的にマウス抗体からヒト化抗体を作製するには、まず、マウス抗体の可変領域中の相補性決定領域(CDR)のアミノ酸をカバット(Kabat)らによる分類に従って決定する(Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987)。このマウス抗体の可変領域中のCDRを中心としたアミノ酸を鋳型となるヒト抗体に移植し、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワークを有する可変領域アミノ酸配列を設計する。この可変領域アミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列をデザインし、

PCR法及び遺伝子組換え技術によりデザイン通りの核酸配列を持つ可変遺伝子断片を作製する。そして、この可変領域遺伝子をヒト抗体の適当なクラスの定常領域遺伝子、好ましくはIgGクラスの抗体の定常領域遺伝子と連結させてヒト化抗体遺伝子を作製する。次いで、このヒト化抗体遺伝子を適当な発現ベクターに連結し、培養細胞中に導入する。最後にこの培養細胞を培養して培養上清からヒト化抗体を得ることができる。

上記ヒト化抗体の作製方法において、マウス抗体の可変領域遺伝子中の相補性決定領域遺伝子は、前記キメラ抗体の作製において明らかとなっているマウス抗体の可変領域遺伝子から、前述のカバット (Kabat) の分類による相補性決定領域の範囲から決定することができる。

一方、鋳型となるヒト抗体のフレームワーク領域遺伝子としては、前記マウス抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列と相同性の高い配列を、例えばヒト抗体のgermlineの中から選び、このアミノ酸配列をコードする塩基配列を常法により作製し、これを用いればよい。

上記したマウス抗体の相補性決定領域遺伝子と鋳型となるヒト抗体のフレームワーク領域遺伝子とを連結してキメラ抗体の作製と同様に遺伝子断片を作製する。この遺伝子断片とヒト抗体の定常領域遺伝子と連結させてヒト化抗体遺伝子（以下、単に「ヒト化抗体遺伝子」という）を作製する。

このヒト化抗体遺伝子の作製につづく、ヒト化抗体遺伝子の発現ベクターへの導入、発現ベクターの培養細胞への導入、培養細胞の培養、抗体の精製等については、上記したキメラ抗体の作製と同様に行うことができる。

なお、一般的に相補性決定領域のアミノ酸だけを置換したヒト化抗体の場合には、オリジナルのマウス抗体よりも抗原結合活性が低下することが多い。そこで、オリジナルのマウスの抗体および相補性決定領域周辺のアミノ酸のいくつかを合わせて移植されることが多い。さらに、結合活性の上昇や親和性向上のために、ヒトフレームワーク領域のみならず可変領域のアミノ酸の改変（1個若しくは複数個のアミノ酸の置換、挿入、欠失など）を行うことも可能であり、この様にして製造された抗体も本発明のヒト化抗体に含まれる。

上記のこの鑄型ヒト抗体に対してマウス抗体の相補性決定領域を中心としたアミノ酸配列を移植した可変領域を発現する遺伝子を作製し、これを上記キメラ抗体の作製と同様に作製することによりヒト化抗体が得られる。

上記したキメラ抗体およびヒト化抗体（以下、「組換えOPN阻害抗体」という）は、オリジナルマウス抗体と同等の抗原活性を有し、かつマウス抗体よりも抗原性の惹起や半減期の短縮等の問題が解消されたものとなる。

かくして得られた組換えOPN阻害抗体は、必要によりさらに精製された後、常法に従って製剤化され、リウマチ性関節炎・若年性関節リウマチや慢性リウマチ等のリウマチ・乾癬性関節炎・乾癬等の治療、臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトーデス・ぶどう膜炎・ベーチェット病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の治療に用いることができる。

本発明の組換えOPN阻害抗体は、好ましくは、リウマチ治療剤あるいはリウマチ性関節炎治療剤として用いることができる。これらリウマチ治療剤等の剤型の例としては、注射剤、点滴用剤等の非経口剤とすることができ、静脈内投与、皮下投与等により投与することが好ましい（自己免疫疾患治療剤とする場合もこれに準じればよい）。また製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた担体や添加剤を使用することができる。

上記製剤化に当たっての組換えOPN阻害抗体の添加量は、患者の症状の程度、年齢や使用する製剤の剤型あるいは組換えOPN阻害抗体の結合力価等により異なるが、例えば0.1mg/kgないし100mg/kg程度を用いればよい。

このようにして得られた本発明の治療剤は、有効成分である組換えOPN阻害抗体がOPNのRGD配列とSVVYGLR配列に強く結合し、OPNのこの部分とインテグリンとの結合を阻害することによって、結果的にリウマチ及びリウマチ性関節炎やそれ以外の自己免疫疾患の症状の増悪を押さえることができる」と期待される。

そして、本発明の組換えOPN阻害抗体は、インテグリン側でなくOPN側

に特異的に結合するものであるため、インテグリンの他の重要な機能を阻害するおそれは少なく、副作用の問題は回避されるものと期待される。

更に本発明の組換えOPN阻害抗体は、自己免疫疾患治療剤をスクリーニングする目的にも使用することができる。すなわち、前述のように、OPNのRGD配列とインテグリンの結合およびSVVYGLR配列とインテグリンとの結合を阻害する化合物は、自己免疫疾患の治療剤となりうる。そこで、例えば、所定量の組換えOPNとインテグリンが存在する測定系内にスクリーニングすべき物質（被検物質）と組換えOPN阻害抗体とを競合的に加えた反応系を構成し、使用した組換えOPN阻害抗体の量に対するOPN-インテグリン間の結合の阻害程度を測定すれば、被検物質の自己免疫疾患治療剤としての利用可能性を評価することができる。

同様に、OPNのRGD配列とインテグリンの結合およびSVVYGLR配列とインテグリンとの結合を阻害する化合物は、リウマチないしはリウマチ性関節炎の治療剤となりうるので、組換えOPN阻害抗体を用いて、上記と同様の反応系を構成すれば、リウマチないしはリウマチ性関節炎のスクリーニングに使用することができる。

更にまた、本発明の組換えOPN阻害抗体は、リウマチ診断剤として利用することができる。先述のように、リウマチ性関節炎患者の関節では、特にトロンプインにより切断されたOPNのN末端フラグメントが高濃度で見出されることが判明している。そこで、この組換えOPN阻害抗体を用いて検体中のOPNまたはそのN末端フラグメントの量を測定すれば、リウマチの診断に役立てることができる。その手法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（E. Engvall et al., (1980): Methods in Enzymol., 70, 419-439）、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁-第53頁、昭和57年3月5日）を利用することができる。

上記手法は種々の観点から適宜選択することができるが、感度、簡便性等の点からはE L I S A法が好ましい。より好ましい方法の例としては、例えば本発明の組換えO P N阻害抗体を担体上に固相化し、本発明の組換えO P N阻害抗体とはO P N上の異なる部位を認識する抗体を標識化することにより、O P NまたはそのN末端フラグメントを検出することができ、これをリウマチ性関節炎の診断薬とすることができる。

上記抗体を標識するにあたり使用される標識物質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ（以下「H R P」という）、アルカリフォスファターゼ（以下「A P」という）等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{125}I 等の放射性物質、化学発光物質などが挙げられる。

より具体的なO P Nアイソフォームの検出方法について、サンドイッチ法を例にとってその手順を説明すれば次の通りである。すなわち、まず、（a）本発明のO P Nアイソフォームに対する抗体を担体に固相化し、次いで、（b）抗体が固相化されていない担体表面を抗原と無関係な、例えばタンパク質により、ブロッキングする。更に、（c）これに各種濃度のO P Nアイソフォームを含む検体を加え、O P Nアイソフォーム－抗体複合体を生成させた後、

（d）標識した抗O P Nアイソフォーム抗体を加え、固相化抗原－抗体複合体と結合させ、最後に（e）担体に結合した標識量を測定することにより、予め作成した検量線から検体中の遊離O P Nアイソフォームの量を決定することができる。

まず、（a）工程において、抗体を固相化するために用いられる担体としては、特別な制限はなく、免疫化学的測定法において常用されるものをいずれも使用することができる。例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレートあるいは、アミノ基結合型のマイクロタイタープレートが挙げられる。また、抗体を固相化させるには、例えば、抗体を含む緩衝液を担体上加え、インキュベーションすればよい。緩衝液としては公知のものが使用でき、例えば10 mMのP B Sを挙げることができる。緩衝液中の抗体の濃度は広い範囲から選択できるが、通常0.01－100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、好ましくは0.1

5 $-20 \mu\text{g}/\text{ml}$ が適している。また、緩衝液の量は、担体として96ウェルのマイクロタイタープレートを使用する場合には、 $300 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 以下で、より好ましくは、 $20-150 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 程度が望ましい。更に、インキュベーションの条件にも特に制限はないが、通常 4°C 程度で一晩インキュベーションが適している。

10 また、(b)工程のブロッキングについては、次の段階で添加する検体中のOPNには抗原抗体反応とは無関係に担体に吸着される部分が存在する場合があるので、そのような非特異的吸着を防ぐ目的で行う。ブロッキング剤としては、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)やスキムミルク溶液を使用できる。
15 あるいは、ブロックエース(「Block-Ace」、大日本製薬、コードNo. UK-25B)等のブロッキング剤として市販されているものを使用することもできる。具体的には、限定されるわけではないが、例えば抗原を固相化した部分に、ブロックエースを適量加え、約 4°C で、一晩インキュベーションした後、緩衝液で洗浄することにより行われる。緩衝液としては特に制限はないが、例えば、 10mM PBS (pH 7.2)、 0.8% (w/v) NaCl、 0.02% (w/v) KCl、 0.02% (v/v) Tween 20の組成のものが適している。

20 次に(c)工程において、OPNアイソフォームを含む検体を固相化抗体と接触させることにより、固相化抗体でOPNアイソフォームを捕捉し、固相化抗体-OPNアイソフォーム複合体を生成させる。反応は限定されるわけではないが、 37°C 程度で約1時間行えばよい。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、未反応の蛋白質等を除去させる。この反応に用いる緩衝液としては、 10mM PBS (pH 7.2)、 0.05% (v/v) Tween 20の組成のものが好ましい。

25 更に(d)工程において、固相化抗体に捕捉されたOPNアイソフォームの別のエピトープを認識する標識抗体を加え、固相化抗体-OPNアイソフォーム-標識抗体複合体を形成させる。この反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、未反応の蛋白質等を除去させることが好ましい。この反応に用いる緩衝液とし

ては、(c) 工程において前記したものが使用される。

上記 (d) 工程において使用される標識抗体は、(a) 工程の固相化抗体と異なるエピトープを認識するものであることが要求される。例えば固相化抗体として O P N アイソフォームの前半領域を認識するポリクローナル抗体を用いる場合、酵素（例えば、H R P または A P 等）を結合した標識抗体としては、O P N アイソフォームの後半領域を認識するポリクローナル抗体を用いることが好ましい。このように異なる部位を認識する抗体を用いることで、選択スプライシングにより生じる O P N アイソフォームを高感度でかつ特異的に測定できる。

(d) 工程において使用される標識抗体の量は、担体に結合した固相化抗体に対して約 5, 0 0 0 - 1 0, 0 0 0 倍、好ましくは最終測定時の最大吸光度が 1. 5 - 2. 0 となるように希釈した標識抗体を反応させるのが望ましい。希釈には緩衝液を用いることができ、反応は限定されるわけではないが、約 3 7 °C で約 3 0 分間行い、反応後、緩衝液で洗浄することが好ましい。以上の反応により、担体に抗体-O P N アイソフォーム-標識抗体複合体を結合することができる。

最後に (e) 工程において、固相化抗体-O P N アイソフォーム-標識抗体複合体の標識物質と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を測定することによって検量線から O P N の量を算出することができる。

標識抗体の標識物として、酵素であるペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素と 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジン (T M B) 又は o-フェニレンジアミン (O P D) を含む発色基質溶液を使用することができる。発色反応は、限定されるわけではないが、発色基質溶液を加え約 2 5 °C で約 2 0 分間反応させた後、1 N の硫酸を加えて酵素反応を停止させることにより行うことができる。T M B を使用する場合、発色は 4 5 0 n m の吸光度により測定する。一方、標識物として、酵素である A P を使用する場合には、p-ニトロフェニルリン酸 (p N P P) を基質として発色させ、2 N の N a O H を加えて酵素反応を止め、4 1 5 n m での吸光度を測定する方法が適している。

既知の濃度のOPNアイソフォームを添加した反応液の吸光度により予め作成しておいた検量線を用いて、検体中のOPNアイソフォームの濃度を算出できる。

上記した本発明のOPNアイソフォームの検出方法は、OPNの働きの解明や、OPNの関連する疾患の診断、治療のために使用されるが、その使用方法の一例としては、トロンビンにより切断されたOPNのN末端フラグメントと非切断型OPNを区別して検出することにより、炎症異常の有無を検出し、例えばリウマチと変形性関節症を区別する炎症異常の検出キットを挙げることができる。

先述のように、リウマチ性関節炎患者の関節腔内では、特にトロンビンにより切断されたOPNのN末端フラグメントが高濃度で見出される傾向があるが、変形性関節炎患者ではそのような傾向は有意に低い。このように、関節腔内のOPN中に占めるN末端フラグメントの割合がそれぞれの患者では異なっているので、リウマチと変形性関節症を区別して診断する為には、OPN全体の中に占めるN末端フラグメントの割合を測定できればよい。

より具体的な例としては、OPNの3種のアイソフォーム、OPN-a、OPN-bおよびOPN-cのすべてに共通に存在する下記3種の配列について、それぞれのペプチドに対する抗体を作製する。

CVDTYDGRGDSVVYGLRS

(C+V153からS169) (1)

KSKKFRRPDIQYPDATDEC

(K170からE187+C) (2)

IPVKQADSGSSEKQC

(I17からQ31+C) (3)

このうち、配列(1)は、トロンビン切断部位のN末端側に存在し、トロンビン非切断型である全長OPNとN末端側フラグメント上で共通に存在する。一方、配列(2)は、トロンビン切断部位よりC末端側に存在し、トロンビン非切断型である全長OPNでは存在するが、N末端側フラグメントには含まれ

ない。また、配列（３）は、ＯＰＮのＮ末端側１７番目から３１番目までのアミノ残基に対応し、トロンビン非切断型である全長ＯＰＮとＮ末端側フラグメントで共通に存在する。リウマチ患者と変形性関節症患者の鑑別の為の診断キットは、上記の３種の配列のペプチドそれぞれに対する抗体を利用した２種類

5 種類の免疫検出試薬から構成することができる。すなわち、第一の免疫検出試薬では、上記の配列（３）および（２）で表されるペプチドに対する２種の抗体を用いて、検体中の両方の抗体で共通に認識されるトロンビン非切断型ＯＰＮを定量する。その際、例えば、配列（３）のペプチドに対する抗体を担体に固相化し、患者由来の検体と反応させ、洗浄した後、標識抗体として配列

10 （２）のペプチドに対する抗体を加え前述のサンドイッチ法と同様の方法で検出することができる。また、第二の免疫検出試薬では、上記の配列（１）および（３）で表されるペプチドに対する２種の抗体を用いて、検体中の両方の抗体で共通に認識されるトロンビン非切断型ＯＰＮとトロンビン切断により生成したＮ末端側フラグメントを合わせた総量を定量する。その際、例えば、配列

15 （１）のペプチドに対する抗体を担体に固相化し、患者由来の検体と反応させ、洗浄した後、標識抗体として配列（３）のペプチドに対する抗体を加え前述のサンドイッチ法と同様の方法で検出することができる。そして、同一の患者検体に対する上記の２種類の免疫検出試薬による結果を比較照合することにより、該患者における全ＯＰＮ中に占めるトロンビン切断により生成したＮ末端側フラグメントの割合を明らかにすることができ、リウマチと変形性関節症の区別

20 が可能となる。

実施例

次に実施例および参考例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は

25 これら実施例等に何ら制約されるものではない。なお、本実施例において市販のキットあるいは試薬を用いた部分については、特に断りのない限り添付のプロトコールに従って実験を行った。

実施例 1

GST-OPN融合蛋白のクローニング、構築、精製および
試薬：

クローニング及び蛋白精製については、基本的に、文献 (S. Kon et al.,
5 (2000): J. Cell. Biochem., 77, 487-498) に記載の方法に従って行った。
ヒトOPNのアイソフォームであるa, bについては、そのcDNAを次のよ
うにして得た。ヒト腎癌細胞株であるNRC-12細胞から調整したRNAを
鋳型としてcDNAを合成し、それを鋳型とし、下記OPN-5、OPN-3
プライマーを用いてPCRを行うことにより、それぞれシグナルペプチド領域
10 を含むヒトOPN-a、OPN-bの全長をコードするcDNAを得た。
次に、上記文献に記載したようにして、このようにしてクローニングしたOP
N-a, OPN-b cDNAを、pGEX4Tベクター (Amersham
Pharmacia Biotech) にGST (グルタチオンS-トランス
フェラーゼ、EC2.5.1.18) 遺伝子と同じリーディングフレームとなる
15 ように挿入し、大腸菌JM109を用いてGST融合蛋白として発現させた
(以下、このようにして得られたGST-OPN融合蛋白を、それぞれ、「G
ST-OPN-a」、「GST-OPN-b」という)。

OPN-5：

5'-CGGGATCCACTACCATGAGAATTG
20 CAGTGATTTGC-3'

OPN-3：

5'-CCGCTCGAGTTAATTGACCTCAGA
AGATGCACTATC-3'

ヒトOPN-cアイソフォームをコードするcDNAについては、上記のO
25 PN-a cDNAを鋳型とし、二段階PCRにより作製した。一段階目はO
PN-5と下記のOPNc t-3プライマー、下記のOPNc t-5とOPN
-3プライマーでそれぞれPCRを行い、二つのPCR産物を混ぜ、熱を加え
徐々に冷却することによりアニールさせ、酵素を加えて伸長させた。次いで二

段階目として、OPN-5とOPN-3プライマーでPCRを行うことによりシグナルペプチド領域を含むヒトOPN-cの全長をコードするcDNAを得た。このアイソフォームc cDNAは、アイソフォームa、bと同様な方法でpGEX4Tベクターに組み換え、GST融合蛋白を作製した（以後、「GST-OPN-c」という）。

OPNc t-3 :

5'-ACACAGCATTTCTTTTCCACAGAAC
TTCCAGAATCAGC-3'

OPNc t-5 :

5'-TGAGGAAAAGAATGCTGTGTCCTC
TGAAGAAAACC-3'

OPN-aのトロンピン開裂部位よりアミノ末端側半分（M1-R168）をコードするcDNAは、上記のOPN-a cDNAを鋳型として、OPN-5と下記のOPNnh-3プライマーを用いてPCRを行うことによって、得られた。アイソフォームa、bと同様な方法でpGEX4Tベクターに組み換え、GSTタンパク質を作製した（以後、「GST-Nhalf」という）。

OPNnh-3 :

5'-GCCTCGAGTTACCTCAGTCCATAA
ACCACTACT-3'

OPN-aのトロンピン開裂部位よりカルボキシル基側のオステオポンチンタンパク質（hOPN Chalf）は、二段階PCRによりOPN-a cDNAを鋳型として作製した。一段階目はOPN-5、下記のOPNch-3プライマー、下記のOPNch-5とOPN-3プライマーでそれぞれPCRを行った。二段階目はOPN-5とOPN-3プライマーでPCRを行うことによりカルボキシル基側OPNタンパク質を作製した。アイソフォームa、bと同様な方法でpGEX4Tベクターに組み換え、GSTタンパク質を作製した（以後、「GST-Chalf」とする）。

OPNch-3 :

5' - T C T T A G A T T T G G C A C A G G T G A T G C
C T A G G A G - 3'

OPNch-5 :

5' - C A C C T G T G C C A A A T C T A A G A A G T T
5 T C G C A G A - 3'

種々の組換えGST-OPN融合蛋白は、常法に従って大腸菌より調製し、
上記文献で述べた方法によりグルタチオン-セファローズカラムを使用して、
精製した。このうち、GST-Nhalf蛋白については、連結部分をプレシ
ジョン・プロテアーゼ (PreScission ; アマーシャム・ファーマシ
ア・バイオテック社) で開裂させることによって、GST蛋白部分を取り除き、
10 OPNのアミノ末端側半分 (I17-R168) のみから構成される蛋白 (以
下、「nOPN」という) を得た。

一方、OPN-aの全長 (M1-N314) をコードするcDNAについ
ては、さらに、pcDNA3.1 (+) ベクター (インビトロゲン社) に挿入
15 し、CHO-K1細胞 (大日本製薬 (株) 社) にトランスフェクトした (以下、
「CHO/OPN-a細胞」という)。この細胞より得られた糖鎖結合型の
OPN-a (以下、「CHO/OPN-a」という) については、以下のよう
にして精製した。即ち、CHO/OPN-a細胞の培養上清をDEAE-セフ
ァローズ CL-6Bカラム (アマルシャム・ファルマシア・バイオテック社)
20 を用いたイオン交換クロマトグラフィー、ULTROGEL AcA44カラ
ム (BioSeptra SA社) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに付し、
これに引き続いて、RESOURCE RPCカラム (アマーシャム・ファル
マシア・バイオテック社) での逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。

免疫感作や結合の研究に用いた種々のペプチドは、シグマ・ゲノシス・ジャ
25 パン社から入手し、あるいは、ペプチド合成機 (モデル432A、パーキンエ
ルマーライフサイエンス社) でFmoc (N-(9-フルオレニル) メトキシ
カルボニル) 法により化学合成した後、C18逆相カラムクロマトグラフィー
で精製することにより得た。

実施例 2

マウスモノクローナル抗体の製造：

下に示すような、ヒトOPNの内部配列に対応する合成ペプチドを用意し、
5 免疫に使用した。

ペプチド1；

CVD TYDGRGDSVVYGLRS (C+V153からS169)

ペプチド2；

CIDSQELSKVSREFHSH (C+I261からH276)

10 このうち、ペプチド1は、それぞれ $\alpha v \beta 3$ と $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンレセプターを認識するRGDとSVVYGLR配列を有する。

これらのペプチドを、サイログロブリン (thyroglobulin) と結合させ、常法に従ってマウスの免疫に用いた。続いて、免疫されたマウスから脾細胞

15 (splenocytes) を分離し、ポリエチレングリコールを用いてマウス骨髓腫細胞P3-X63-Ag8-653と細胞融合に付した。そして、文献 (M. Kinebuchi et al., (1991): J. Immunol., 146, 3721-3728) に述べた方法により、免疫に使用したペプチドに反応するハイブリドーマを選択した。

20 ペプチド1および2で免疫したマウスから、それぞれ2K1および4C1と名付けたモノクローナル抗体を得た。なお、モノクローナル抗体2K1を産生するハイブリドーマについて、2001年6月20日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) にFERM BP-7883として寄託した。また、モノクローナル抗体53 (mAb53) は、全長組換えヒトOPNで免疫することにより得られたものである (D. S. Bautista et al., (1994): J. Biol. Chem., 269, 23280-23285)。

実施例 3

OPNおよびそのトロンビン消化物とマウスモノクローナル抗体の

反応性：

実施例 2 で得られたマウスモノクローナル抗体 2 K 1 (以下、「マウス 2 K 1 抗体」という) および 4 C 1 の O P N およびそのトロンピン消化物に対する結合能をウエスタンブロット法を用いて試験した。マウス 2 K 1 抗体は G S T
5 - O P N - a、G S T - O P N - b、G S T - O P N - c および G S T - N h
a l f と反応することがわかった。また、4 C 1 抗体は G S T - O P N - a、
G S T - O P N - b、G S T - O P N - c および G S T - C h a l f と反応することがわかった。更に、これらのモノクローナル抗体は、大腸菌から生産した糖鎖非結合型の組換え O P N と結合するばかりでなく、糖鎖結合型 C H O /
10 O P N - a 蛋白及びそのトロンピン消化物 (以下、「トロンピン開裂 O P N」
という) とともに反応した。

実施例 4

マウスモノクローナル抗体による O P N に対する細胞接着の阻害：

15 マウスモノクローナル抗体が O P N に対する細胞の接着を阻害するかどうか
を以下の方法で調べた。まず、96穴プレートを、4℃で一晩、種々の濃度の
C H O / O P N - a でプレコートし、次いで10分間、37℃の条件で0.
5% B S A の P B S により非特異的接着をブロックするための処理を行った。
ヒト線繊維芽細胞 T I G - 7 またはインテグリン $\alpha 9$ サブユニット c D N A で
20 形質転換した S W 4 8 0 細胞 (以下、「 $\alpha 9$ 形質転換 S W 4 8 0 細胞」とい
う) を、0.25% B S A を含む D - M E M に懸濁させ、細胞懸濁液 (細胞濃
度は、 5×10^4 細胞/ウエル) 200 μ l を、種々の濃度のモノクローナル
抗体または合成ペプチドの存在または不存在下で C H O / O P N - a または n
O P N でプレコートした96穴プレートに注入し、1時間、37℃でインキュ
25 ベートした。

培地をプレートから除去し、全てのウエルを0.25% B S A を含む D - M
E M で2回洗浄した。接着した細胞は固定し、20%メタノール中の0.5%
クリスタルバイオレットで30分間染色した。

全てのウェルは、水で3回すすぎ、接着した細胞は20%酢酸により転溶させた。各ウェルから得られた結果物の上清をイムノリーダーで分析し、590 nmの吸収をウェルに接着した細胞の相対的数を求めるために測定した。全てのアッセイは、3回行い、少なくとも3つの独立した実験を行った。示される値は、少なくとも3つの別々の実験の平均である。

TIG-7はOPNに良く接着することが知られているが、図1のAに示されているように、この接着は明らかにGRGDSPペプチド ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) で阻害され、コントロールペプチド (OPNのC末部分であるK296-N314) ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) で阻害されないため、RGD依存である。また、図1のBに示すように、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス2K1抗体はOPNに対する細胞接着を阻害することが明らかになった。更に、図1のCに示すように、マウス2K1の細胞接着阻害効果は、mAb53が示すものに匹敵し、濃度依存的である。なお、マウス2K1およびmAb53は、TIG-7細胞のビトロネクチン (VN) やフィブロネクチン (FN) への接着は阻害しない。

図2は、nOPNおよびビトロネクチンと、 $\alpha 9$ 形質転換SW480細胞との接着に対するモノクローナル抗体の阻害を示した図面である。図2のAに示すように、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のビトロネクチンと $\alpha 9$ 形質転換SW480細胞との接着は、 $200 \mu\text{M}$ のGRGDSPペプチド (RGD) で阻害されることからRGD依存である。 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ のnOPNに対する $\alpha 9$ 形質転換SW480細胞の接着は、 $200 \mu\text{M}$ のGRGDSPペプチド (RGD) と抗 $\alpha 9 \beta 1$ モノクローナル抗体であるY9A2 (A. Wang et al., (1996): Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 15, 664-672) を併用することにより阻害されることから、RGD依存および非依存性の接着である。また、図2のBは、 $\alpha 9$ 形質転換SW480細胞とnOPNおよびビトロネクチンの接着に対するマウス2K1抗体の影響を示している。 $\alpha 9$ 形質転換SW480細胞とビトロネクチンの接着は、マウス2K1抗体により阻害されないが、nOPNとの接着はマウス2K1抗体により阻害される。この結果、マウス2K1抗体はRGD依存性の接着阻害能を保持していることが判明した。

実施例 5

マウスモノクローナル抗体によるOPN-誘導単球遊走の阻害：

U937細胞を用いた細胞遊走試験は、Chemotax 101-8システム
5 (ニューロプローブ社)を用いて行った。細胞は、0.1%BSAを含むD-MEMで $2 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整し、フィルター(ポアサイズ $8 \mu\text{m}$)の上層に加え、下層にはOPNタンパク質を加えた。

Chemotaxプレートは、 37°C 、5% CO_2 存在下で4時間静置した。
静置後、フィルターをメタノールで固定し、ヘマトキシリンおよびエオシン

10 (H-E)で染色した。フィルターの裏面まで遊走した細胞数を顕微鏡下、倍率400倍で算定した。試験は3回行い、その平均をデータとした。この結果を図3に示す。

図3aは、表示された濃度における、CHO/OPN-a、トロンビン開裂OPNおよびGST-Nha1fに対するU937細胞の細胞遊走を示す。また、図3bは、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原特異精製されたマウス2K1抗体、mAb53または対照であるマウスIgGの存在または不存在下、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の各OPNを用いた阻害アッセイである。

図3aおよび図3bに示されるように、CHO/OPN-a、トロンビン開裂OPNおよびGST-Nha1fは、ヒト単球細胞U937の遊走を濃度依存的に誘導する(A)。マウス2K1抗体は、CHO/OPN-a、トロンビン開裂OPNおよびGST-Nha1fにより誘導された単球細胞遊走を明らかに阻害する。これに対し、mAb53は、全長OPNにより誘導される単球細胞遊走を阻害するだけである(B)。

25 参考例 1

OPNと関節炎誘発：

関節炎におけるOPNの働きを明らかにするため、常法に従ってOPN遺伝子欠損マウス(S. R. Rittling et al., (1998): J. Bone Miner. Res., 13

(7), 1101-1111) を人工的に作製し、正常なマウスと比較実験を行った。

OPN遺伝子欠損マウス (OPN^{-/-}) と正常マウス (OPN^{+/+}) のそれぞれに、関節炎を引き起こす薬剤として市販されている関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル (商品名: 関節炎用カクテル、Arthrogen-CIA[®] mAb, Arthritogenic mAb cocktail、岩井化学薬品社製) を用い、製品添付書類に従い投与し、関節炎を惹起し、その程度を観察した。対照としては、両マウスに生理食塩水を投与したものをを用いた。

関節炎の程度は、下記に従った関節炎スコアと、投与10日後のリストの腫れで比較した。この結果を図4および図5に示す。

図4から明らかなように、関節炎用カクテル/リポポリサッカライド (以下、「LPS」という) を投与された正常マウスでは、4日目から関節炎スコアが上昇し、10日目で最高 (12以上) に達した。これに対し、OPN遺伝子欠損マウスでは、5日目から関節炎スコアは上昇するものの、最高でも4以下であった。また、生理食塩水を投与した群では、いずれも関節炎スコアの上昇が見られなかった。

また、図5に見るように、リストの腫れ (手首の腫れ) もOPN遺伝子欠損マウスは正常マウスに比べて明らかに弱く、関節炎に対しOPNが関係していることが明らかである。

実施例 6

マウス2K1抗体のヒト末梢血白血球遊走に対する阻害活性:

下記方法により、マウス2K1抗体のサイトカイン活性化ヒト末梢血白血球遊走に対する阻害活性を調べた。好中球遊走阻害活性についての結果を表1に、単球遊走阻害活性についての結果を表2にそれぞれ示す。

< 実験方法 >

健常人ヒト末梢血からフィコール (Ficoll) 法にて単核球画分と好中球画分を分離した (P. M. Daftarian et al., (1996): Journal of Immunology, 157, 12-20)。単球はフィコールと血清の中間層を採取し、フラスコにて3

7℃で1時間培養した後に付着した細胞を用いた。単球画分を採取した残りの赤血球層に3%デキストラン-PBSを5倍量加えて赤血球を凝集させてから、150×g、4℃で5分間遠心した。

凝集した赤血球が沈殿し、上清には好中球が懸濁状態で存在するので、この画分を500×g、室温で20分間遠心すると好中球が得られた。このようにして得られた単球と好中球をヒトTNF-α(20ng/mL)で一晩培養し、活性化したものを遊走実験に用いた。

遊走実験は48-ウエル マイクロ ケモタキシス チャンバー (micro chemotaxis chamber) (Neuro Probe Inc. 製) を用いて行った。トロンビン開裂OPNに、マウス2K1抗体を種々の濃度で添加したものを予め37℃で15分間放置してから、ローワー チェンバー (Lower chamber) に加えた (ヒトOPN最終濃度は 10μg/mL)。その上からポリカーボネートフィルター (ポアサイズ 5μm) を載せて、さらにアップパー チェンバー (Upper chamber) に50μLの細胞懸濁液 (2×10⁶cells/mL) を加えた。

37℃、5%CO₂存在下で2時間培養してから、ポリカーボネートフィルターを取り外して、フィルター上側表面の細胞を除去してから、フィルターの裏側に浸潤した細胞をディフクイック (Diff-Quick) (Baxter 社製) にて染色した。染色した細胞数を40倍の倍率下で計測した。この結果は6ウエルの平均細胞数 (cells/mm³) ±SDとして示した。

< 実験結果 >

マウス2K1抗体は、TNF-αで活性化したヒト末梢血好中球および単球のトロンビン開裂OPNに対する遊走を阻害した。

好中球遊走阻害：

【表 1】

トロンピン開裂OPN 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	マウス 2 K 1 抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	1 mm ³ あたりの 平均遊走細胞数
0	0	400.0 \pm 67.8**
1 0	0	581.7 \pm 67.1
1 0	0.4	566.7 \pm 60.2
1 0	2	550.0 \pm 49.0
1 0	1 0	450.0 \pm 90.8**
1 0	5 0	426.7 \pm 30.8**

** P<0.01 (one way ANOVA, Dunnett's test)

単球遊走阻害：

5 【表 2】

トロンピン開裂OPN 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	マウス 2 K 1 抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	1 mm ³ あたりの 平均遊走細胞数
0	0	58.3 \pm 50.8**
1 0	0	285.0 \pm 49.3
1 0	0.4	258.0 \pm 71.9
1 0	2	256.7 \pm 66.5
1 0	1 0	160.0 \pm 56.9**
1 0	5 0	75.0 \pm 55.4**

** P<0.01 (one way ANOVA, Dunnett's test)

実施例 7

キメラ 2 K 1 抗体発現プラスミドの作製：

- 10 国際公開番号 WO 94/20632 の国際公開公報に記載の抗 HIV モノクローナル抗体 (C 2 5 抗体) のキメラ抗体の作製方法に準じて、実施例 2 で得られたマウス 2 K 1 抗体の重鎖可変領域 (VH) 遺伝子をヒト Ig γ 1 遺伝子に、軽鎖可変領域 (VL) 遺伝子をヒト Ig κ 遺伝子に連結してマウスーヒトのキメラ 2 K 1 抗体 (以下、「キメラ 2 K 1 抗体」あるいは「C 2 K 1 抗体」
- 15 ということもある) を作製した。

まず、マウス 2 K 1 抗体産生ハイブリドーマから ISOGEN 試薬 (ニッポ

ンジーン社)を用いてmRNAを抽出し、それを鋳型として用い、pd (N) 6 Random Hexamer及びReady-To-Go You-Prime First-Strand Beads (ともにAmersham Biosciences社)を用いてcDNAを合成した。

5 次に、このcDNAを鋳型として用い、カバット (Kabat) らによるV領域及びJ領域の核酸配列の分類 (Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987) に従ってデザインした、下に示すマウス 2K1 抗体のVH遺伝子のリーダー配列に合致するプライマーとVH遺伝子のJ領域に合致するプライマーを用い、Ex Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造) でVH領域を増幅した。

10 リーダー配列プライマー (VH) :

5' -TTCGAAGCTTGCCGCCACCATGGAATG
GAGCTGGATCTTT-3'

J領域プライマー (VH) :

15 5' -GAAGATCTGGATCCACTCACCTGAGGA
AACTGTGA-3'

ここで用いたリーダー領域に対するプライマーとJ領域に対するプライマーは、それぞれクローニングのための、制限酵素HindIII認識配列とBamHI認識配列を含んでいる。

20 一方、VL遺伝子についてもVH遺伝子の場合と同様に、下記に示すリーダー配列に合致するプライマーとJ領域に合致するプライマーを用いて、HindIII認識部位とBamHI認識部位を両端に持つVL遺伝子断片を得た。

リーダー配列プライマー (VL) :

25 5' -CTTAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTG
CCTGTTAGGCTG-3'

J領域プライマー (VL) :

5' -CTAGATCTGGATCCACTTACGTTTCAG
CTCCAGCTT-3'

このようにして得たVH、VL遺伝子断片をHindIIIとBamHI
(ともに宝酒造)で消化し、それぞれを、発現ベクターであるAG- γ 1、AG- κ (国際公開公報WO94/20632)に組み込んだ。このうち、AG- γ 1は β アクチンプロモーター、ヒト免疫グロブリン定常領域 γ 1鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子(neo)を持ち、 γ 1
5 遺伝子の上流にあるHindIII認識配列とBamHI認識配列の間にマウス2K1抗体VH遺伝子を挿入することにより、キメラ2K1抗体の重鎖を発現するプラスミドとなる。また、AG- κ は β アクチンプロモーター、ヒト免疫グロブリン定常領域 κ 鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)を持ち、同じく κ 遺伝子の上流にあるHindIII
10 I認識配列とBamHI認識配列の間にマウス2K1抗体VL遺伝子を挿入することにより、キメラ2K1抗体の軽鎖を発現するプラスミドとなる。

これらの発現プラスミドを常法により大腸菌HB101株に導入して大量培養し、EndoFree Plasmid Mega Kit (QIAGEN
15 社)を用いて精製した。

実施例 8

キメラ2K1抗体の発現：

上記実施例7で精製したキメラ2K1抗体の重鎖、軽鎖発現プラスミドを混合して、一般的に行われるリン酸カルシウム法によりCHO-DG44細胞株
20 にトランスフェクションした。0.5mg/mLのGeneticin (Invitrogen社)及び透析によりヌクレオチドを除いたFCS (Invitrogen社)を10%添加したMEM培地 (Invitrogen社)でセレクションすることにより、キメラ2K1抗体を産生する形質転換細胞を得た。
25

この細胞を2%の透析済FCSを添加したMEM培地500mL中で培養し、得られた培養上清をプロテインAカラム (Amersham Biosciences社)に通した後、PBSに対して透析を行うことにより精製キメラ2

K 1 抗体を得た。精製キメラ 2 K 1 抗体の濃度は、D C プロテインアッセイキット（B I O - R A D 社）を用いて決定した。最終的に 1 . 4 m g の精製抗体を得ることができた。

5 実施例 9

キメラ 2 K 1 抗体のヒト末梢血単核球遊走に対する阻害活性：

上記実施例 8 で得られた精製キメラ 2 K 1 抗体のサイトカイン活性化末梢血単核球遊走に対する阻害活性を次のようにして調べた。

まず、健常人よりヘパリン採血した血液を R P M I 1 6 4 0 培地にて 2 倍希釈した。希釈した血液をフィコールパック（F i c o l l - P a q u e ; フアルマシア社）に重層し、4 0 0 × g で室温にて 3 0 分間遠心した。血漿とフィコールパックの境界に見える白い層を回収し、単核球として用いた。このようにして得られた単核球をヒト T N F - α（2 0 n g / m L）で一晩培養し、活性化したものを遊走実験に用いた。

15 遊走実験は 4 8 - ウエル マイクロ ケモタキシス チャンバー（m i c r o c h e m o t a x i s c h a m b e r ; ニューロ プロブ インク社）を用いて行った。ヒト O P N をウシトロンビン（S i g m a）と共に 3 7 ° C、2 時間反応させて切断した。2 K 1 キメラ抗体を種々の濃度で添加したものを予め 3 7 ° C で 1 5 分間放置してから、下側チャンバーに加えた（ヒト O P N 最終濃度は 1 0 μ g / m L）。その上からポリカーボネート フィルター（ポアサイズ 5 μ m）を載せて、さらに上側チャンバーに 5 0 μ L の細胞懸濁液（2 × 1 0 ⁶ c e l l s / m L）を加えた。

20 3 7 ° C、5 % C O ₂ 存在下で 2 時間培養してから、ポリカーボネートフィルターを取り外して、上側フィルター表面の細胞を除去してから細胞を D i f f - Q u i c k（B a x t e r 社）にて染色した。上側フィルター表面の細胞数を 4 0 倍の倍率下で計測し、結果は 6 ウエルの平均細胞数（c e l l s / m m ³） ± S D として示した。

この結果、表 3 に示すようにキメラ 2 K 1 抗体は、T N F - α で活性化したヒト末梢血好中球およびモノサイトのトロンビン切断型 O P N に対する遊走を阻害した。

単核球遊走阻害活性：

5 【表 3】

トロンビン開裂 O P N 濃度 (μ g/mL)	キメラ 2 K 1 抗体濃度 (μ g/mL)	1 mm ³ あたりの 平均遊走細胞数
0	0	955.0 \pm 73.6 **
10	0	1335.0 \pm 106.9
10	12.5	1010.0 \pm 59.1 *
10	25	1153.3 \pm 96.2
10	50	895.0 \pm 78.0 **
10	100	821.7 \pm 50.2 **
10	250	865.0 \pm 64.9 **
10	500	830.0 \pm 44.1 **

* P<0.05, ** P<0.01 (one way ANOVA, Dunnett's test)

実施例 10

キメラ 2 K 1 抗体の K D 値測定

- 10 次のようにして、キメラ 2 K 1 抗体の K D 値を測定した。まず、ヒトオステオポンチン部分ペプチド G R G D S V V Y G L R を、ビオチナイラーションキット（（株）同仁化学研究所）でビオチン化した。B I A C O R E - 2 0 0 0 にセンサーチップ S A をセットし、リガンド（B i n - G R G D S V V Y G L R）を 2 3 R U 結合させた。続いて、マウス 2 K 1 抗体をアナライトとして
- 15 流し、図 6 a に示すセンサーグラムを得た。また、キメラ 2 K 1 抗体をアナライトとして流し、図 6 b に示すセンサーグラムを得た。ここで、それぞれの図の横軸は時間、縦軸は、相対的レスポンス（Relative response、R U）を表している。これらのセンサーグラムのデータは B I A C O R E 社解析ソフト B I A エバリュエーション バージョン 3. 0 により 1 : 1 (L a n g m u i r)
- 20 r) バインディングのグローバル フィッティングで解析した。この結果を図 6 に示す。図 6 a はマウス 2 K 1 抗体の様々な濃度におけるセンサーグラムであ

り、図6bはキメラ2K1抗体の様々な濃度におけるセンサーグラムである。

この測定の結果、マウス2K1抗体のKD値は 1.2×10^{-10} Mであり、キメラ2K1抗体のKD値は 9.2×10^{-11} Mであった。キメラ2K1抗体は、マウス2K1抗体のキメラ化によるアフィニティーの低下は認められなかった。

実施例 11

ヒト化2K1抗体遺伝子の作製：

マウス2K1抗体のVH及びVL中の相補性決定領域（CDR）アミノ酸の移植先となる鋳型ヒト抗体は、マウス2K1抗体のVH、VLのフレームワーク（FR）のアミノ酸配列に対して、それらと相同性の高いアミノ酸配列を持つヒト抗体のgermlineの中から選んだ。具体的には、鋳型ヒトVHとしてはDP-88（Accession No. Z49804）にJH6（Accession No.

X69866）を組み合わせたもの、鋳型ヒトVLとしてはDPK-13

（Accession No. X93631）にJκ2（Accession No. AJ399904）を組み合わせたもの及びDPK-18（Accession No. X93635）にJκ2を組み合わせたものを選んだ。マウス2K1抗体のVHアミノ酸配列（配列番号19）およびVLアミノ酸配列（配列番号20）と、これらの鋳型ヒト抗体のVH、VLアミノ酸配列との比較をそれぞれ図7及び図8に示した。CDRの範囲は前述のカバットらの分類における記述に準じた。

VHのCDRは下記のアミノ酸配列を有するものであった。

CDR1（配列番号21）：DYEMH

CDR2（配列番号22）：AIHPGRGGTAYNQKFKG

CDR3（配列番号23）：ITGYFDV

また、VLのCDRは下記のアミノ酸配列を有するものであった。

CDR1（配列番号24）：RSSQSIVHSNGNTYLE

CDR2（配列番号25）：KVSNRFS

CDR3（配列番号26）：FQGSHVPLT

上記の鋳型ヒト抗体のVH、VLに、マウス2K1抗体のVH、VLから必要なアミノ酸配列を移植してヒト化抗体を作製した。具体的には、CDRアミノ酸配列をマウス2K1抗体のCDRアミノ酸配列で置換したアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列をデザインし、次項に記すように、PCR及び遺伝子組換え技術によりデザイン通りの核酸配列を持つ遺伝子断片を作製した。

VLについてはFR2のみ、マウス2K1抗体との相同性がより高いDPK13のアミノ酸配列を採用し、他のFR部分はDPK18のものを採用した。VHについてはFR4のみJH6のアミノ酸配列を採用し、他のFR部分はDP-88のものを採用した。

上記で作製したヒト化2K1抗体（以下、「R2K1抗体」ということもある）のVH、VLアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を、それぞれ図9（配列番号27および28）及び図10（配列番号29および30）に記載した。ここで、抗体のリーダー配列としては、PCT国際公開番号WO94/20632に記載の、ヒト化抗HIVモノクローナル抗体（RC25抗体）で使用されていたのと同じものを使用した（図9および図10の下線部）。また、VH、VLをコードする塩基配列の両端には、クローニングのためのHindIII及びBamHI認識部位が付加されている。

実際に、図9及び図10に示した塩基配列を持つDNA断片を得るために、オリゴDNAを材料としたPCRによる全合成を行った。具体的にはVHについては、図11に示したように、図9のVHの塩基配列の全長をカバーするように6本のオリゴDNA（配列番号31～36）をデザインして合成し、それらを用いて次の手順でPCRを行った。すなわち、まず6種類のオリゴDNAを各々10 pmolずつ混合したものを鋳型として、Pyrobest DNAポリメラーゼ（宝酒造）を用いて、96℃で20秒、55℃で30秒、72℃で3分のステップを10サイクル繰り返した。次に、このPCR産物の1 μLを鋳型として用い、図11の下線部の配列を持つオリゴDNA（配列番号37及び38）をプライマーとして、Pyrobest DNAポリメラーゼを用いて、96℃で20秒、72℃で3分のステップを25サイクル繰り返す

ことにより、VHの全長を増幅した。得られたDNA断片は、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて pCR-Bluntベクターとライゲーションした後、大腸菌に導入することによりクローニングした。得られた大腸菌クローンからQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN社)を用いてプラスミドDNAを調製し、それを鋳型として用い、M13-M4プライマーとM13-RVプライマー（ともに宝酒造）とCEQ DTCS-Quick Start Kit (BECKMAN COULTER社)を用いてシーケンシング反応を行い、CEQ2000オートシーケンサー (BECKMAN COULTER社)により、クローニングされているDNAの塩基配列を解読することにより、図9のデザイン通りの塩基配列を持つクローンを得た。

VLの場合は、図12に示した6本のオリゴDNA（配列番号39～44）を用いて、上記と同様に10サイクルのPCRを行った後、その増幅産物を鋳型として用い、図12の下線部の配列を持つオリゴDNA（配列番号45および46）をプライマーとして、上記と同様の25サイクルのPCRを行った。その後、VHの場合と同様の操作を行うことにより、図10のデザイン通りの塩基配列を持つクローンを得た。

実施例 12

ヒト化2K1抗体発現プラスミドの作製：

実施例7に記載したキメラ2K1抗体発現プラスミドの作製の場合と同様にして、ヒト化2K1抗体発現プラスミドを作製した。実施例11で作製したヒト化2K1抗体のVH、VL遺伝子を持つクローンから常法によりプラスミドDNAを抽出し、それをHindIII及びBamHIで消化して得られたVH、VLのDNA断片を、それぞれ前述の発現ベクターAG- γ 1、AG- κ に組み込んだ。こうして得られた、ヒト化2K1抗体の重鎖、軽鎖の発現プラスミドを大腸菌に導入して大量培養し、それをもとにトランスフェクション用の重鎖、軽鎖発現プラスミドDNAを精製した。

実施例 13

ヒト化2K1抗体の発現：

実施例12で調製したヒト化2K1抗体の重鎖、軽鎖発現プラスミドを混合
5 して、リン酸カルシウム法によりCHO-DG44細胞株にトランスフェクシ
ョンした。0.5mg/mLのGeneticin及び透析済FCSを10%
添加したMEM培地で3日間培養して得られた培養上清を用いて、その中に含
まれるヒト化2K1抗体の抗原結合活性をELISA法により確認した。まず、
ヤギ由来抗ヒトIgG Fc抗体(CAPPEL社)とプロテインA-HRP
10 (ZYMED社)を用いたサンドイッチELISAを行って、培地中に含まれ
るヒト化2K1抗体濃度を測定した。この際、市販のヒトIgG1抗体(Bi
ogenesis社)の希釈系列を作製し、それを標準試料とした。また前述
のキメラ2K1抗体についても上記のELISAによる濃度測定を行った。

15 実施例 14

キメラ2K1抗体およびヒト化2K1抗体とオステオポンチンペプチド
との結合性確認：

実施例13で決定したヒト化2K1抗体及びキメラ2K1抗体の濃度に基づ
いて、ヒト化2K1抗体とキメラ2K1抗体のオステオポンチンペプチド(C
20 VDTYDGRGDSVVYGLRS)に対する結合活性を、今らのELISA
法(Journal of Cellular Biology, 88:420-432(2002))を参考にして比較
した。

BSAにオステオポンチンペプチドを架橋したもの(BSA-CVDTYD
GRGDSVVYGLRS)を固定したマイクロタイタープレートに対して、
25 ヒト化2K1抗体及びキメラ2K1抗体の希釈系列を反応させ、BSA-CV
DTYDGRGDSVVYGLRSに結合した抗体にプロテインA-HRPを
反応させ、最終的にTMB(同仁化学研究所)を反応させた後、450nmの
波長における吸光度を測定した。

また、ネガティブコントロールとして、単にBSAだけを固定したプレートに対する反応も同様に測定した。これらの結果を図13に示した。

なお、図13において横軸は抗体濃度、縦軸は吸光度であり、●はキメラ2K1抗体のBSA-CVD TYDGRGDS VVYGLRSに対する結合性を、
5 ■はヒト化2K1抗体のBSA-CVD TYDGRGDS VVYGLRSに対する結合性を示している。またネガティブコントロールとして、キメラ2K1抗体のBSAに対する結合性(○)と、ヒト化2K1抗体のBSAに対する結合性(□)も示した。

この結果、ヒト化2K1抗体とキメラ2K1抗体は、BSAに対する結合性を示さず、BSA-CVD TYDGRGDS VVYGLRSに対してのみ結合性を示したことから、これらの抗体の結合性はオステオポンチンペプチドに特異的であることが判った。また、両抗体のBSA-CVD TYDGRGDS VVYGLRSへの結合性は同等であることも判った。

前述のように、キメラ2K1抗体とオリジナルのマウス2K1抗体は同等の抗原結合活性を持つことに基づけば、本願発明で作製したヒト化2K1抗体が
15 オリジナルのマウス2K1抗体と同等の活性を持つことは明らかである。

実施例 15

M5抗体の製造：

20 下に示すような、マウスOPNの内部配列(C+V138からR153)に対応する合成ペプチドを用意し、免疫に使用した。

M5ペプチド：

CVDVPNGRGDSLAYGLR

このペプチドをサイログログリリンと結合し、これを用い常法に従ってウサギを免疫した。免疫されたウサギの抗血清を採取し、M5ペプチドN末のステインとチオールセファロースビーズ(アマシャムファルマシアバイオテック社)とをジスルフィド結合により結合させたカラムを用いてM5抗体を製造した。

実施例 16

OPNおよびそのトロンピン消化物とM5抗体の反応性：

5 実施例15で得られたM5抗体のOPN、およびそのトロンピン消化物に対する結合能はウエスタンブロット法を用いて試験した。用いたOPNはCHO細胞から生産されたグリコシル化フォームの組換えマウスOPNを用いた。M5抗体はOPNおよびそのトロンピン消化物と反応した。

実施例 17

10 M5抗体によるOPNに対する細胞接着の阻害：

M5抗体がOPNに対する細胞接着を阻害するかどうかを、文献（S. Kon et al., (2002): J. Cell. Biochem., 84(2), 420-432）に述べた方法で調べた。OPNは、プレシジョン・プロテアーゼ（アマシャムファルマシアバイオテック社）によりGST部を除去した全長マウスOPN（以下、「mOPN/de-GST」という）を使用した。細胞はマウスNIH3T3細胞を使用した。

図14に示されているように、NIH3T3細胞はmOPN/de-GSTに対し濃度依存的に接着する。また、図15に示すように、この接着は明らかにGRGDSPペプチド（ $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で阻害されるので、RGD依存である。図16に示すように、 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ のM5抗体はOPNに対する細胞接着を阻害することが明らかとなった。

実施例 18

M5抗体のマウス脾臓由来単核球遊走に対する阻害活性：

25 下記方法により、M5抗体のサイトカイン活性化マウス脾臓由来単核球遊走に対する阻害活性を調べた。この結果を表4に示す。

< 実験方法 >

C57BL/6マウスの脾臓細胞をスライドガラスですり潰して単細胞にし

てから、フラスコにて37℃で1時間培養して付着した細胞を単球として用いた。この単球をヒトTNF- α (20 ng/mL)で一晩培養し、活性化したものを遊走実験に用いた。遊走実験は、前記実施例6のヒトの場合と同様の方法で行った。

5 < 実験結果 >

M5抗体は、全長マウスOPN (Genzyme社製)をウシトロンビン (Sigma社製)にて切断した得られたトロンビン切断型マウスOPNに対するTNF- α で活性化したマウス脾臓由来単球の遊走を阻害した。

【表4】

トロンビン切断型マウス OPN濃度 (μ g/mL)	M5濃度 (μ g/mL)	1mm ³ あたりの 平均遊走細胞数
0	0	428.3 \pm 52.7*
10	0	556.7 \pm 46.3
10	0.8	570.0 \pm 75.6
10	4	536.7 \pm 60.6
10	20	461.7 \pm 104.4
10	100	468.3 \pm 67.9

10 * P<0.05 (one way ANOVA, Dunnett's test)

実施例 19

M5抗体の骨破壊抑制作用：

15 下記方法により、M5抗体のマウスカルバリア器官培養系における骨破壊抑制作用を調べた、この結果を表5に示す。

< 実験方法 >

20 生後1日目の仔マウスの頭蓋骨を切り出し、その半分を大きさを揃えてから24ウエルプレート各ウエルに入れた。これらに、ヒトパラチロイドホルモン (Parathyroid hormone, PTH) (1-34)を最終濃度が10 nMになるようにD-MEM培養液 (10%ウシ血清添加)に添加したものを加えて骨破壊を引き起こした。M5抗体は、最終濃度200 μ g/mLになるように添加した。37℃で1週間培養した後に、骨から培養液中へ遊離したカルシウム

量をカルシウムEテストワコー（和光純薬）にて定量した。

< 実験結果 >

P TH未添加では、7.02 mg/mLのカルシウム値を示したが、P TH添加により、9.11 mg/mLと骨からのカルシウムの遊離促進が見られた。
 5 M 5抗体を200 μ g/mLの濃度で添加しておく、骨吸収が約70%阻害されることが確認された。

【表5】

	カルシウム放出量 (mg/dL)
メディウム	7.02 \pm 0.18**
P THコントロール	9.11 \pm 0.17
M 5	7.65 \pm 0.25**

** P<0.01 (one way ANOVA, Dunnett's test)

10 実施例 20

M 5抗体のマウスコラーゲン関節炎モデルにおける効果：

下記方法により、M 5抗体のマウスコラーゲン関節炎モデルにおける効果を調べた。関節炎スコアについての結果を表6に、足浮腫に対する結果を表7に、
 15 体重変化についての結果を表8に、摂餌量変化についての結果を表9にそれぞれ示す。

< 実験方法 >

関節炎の惹起には、コラーゲンに特異的な4つのエピトープを認識する関節炎惹起抗体カクテル（商品名：関節炎用カクテル、Arthrogen-CIA[®] mAb, Arthritogenic mAb cocktail、岩井化学薬品社製）を用いた。マウスに、
 20 この関節炎カクテルを静脈内投与し、その3日後にL P S（100 μ g）を腹腔内投与することにより惹起した。関節炎はL P S投与後3日目から観察され、6日目で最大となった。

M 5抗体については、L P S投与直前と3日後に、40 μ g、150 μ gまたは400 μ gの用量で静脈内投与した。そのコントロール群にはウサギIg

G投与群（投与量：400 μ g）をおいた。また、抗マウスTNF- α 抗体については、LPS投与直前と3日後に、200 μ g/マウスの用量で静脈内投与した。そのコントロール群にはラットIgG投与群（投与量：200 μ g）をおいた。また、MTXについては、LPS投与日から一日一回の頻度で経口（投与量：3.2mg/kg）で投与した。その際、MTXは、0.5%メチルセルロース溶液5mlに溶解したものをを用いた。そのコントロール群としては、0.5%メチルセルロース溶液5mlをおいた。

評価は、1群5匹ずつで、関節炎スコア、足浮腫、体重変化、摂餌量の4項目に関して行った。

< 実験結果 >

M5抗体は、表6から表9に示すようにマウス関節炎モデル（治療効果）に対し、関節炎スコアの改善、発症遅延や足浮腫の改善など明確な抑制作用を示した。関節炎の発症は、用量依存的に抑制され、その程度は、抗マウスTNF- α 抗体（投与量：200 μ g/マウス）投与による効果を上回るものであった。これに対して、MTXはほとんど薬効を示さなかった。

さらに、本モデルのノーマル群では、LPS投与後3日間で、約3gという著しい体重減少が観察され、この傾向は、減少率はやや緩和されるものの、3-6日目まで続いた。これに対し、M5抗体（150 μ g, 400 μ g）投与群及び抗マウスTNF- α 抗体投与群では、明らかな体重減少の改善が認められた。また、摂餌量については、LPS投与後3日目までは、いずれの薬剤についても激しい体重減少が観察されたが、3-6日目にかけては、M5抗体投与群及び抗マウスTNF- α 抗体投与群で改善が認められた。関節スコアに対する効果を表6に、足浮腫抑制効果を表7に、体重変化および摂餌量変化をそれぞれ表8および表9に示す。

【表 6】

日 数	ウサギ 1 g G 投与群 (投与量; 400 μ g/マウス)	M5 抗体投与群 (投与量; μ g/マウス)		
		40	150	400
3	1.2 \pm 1.1	2.4 \pm 1.7	1.0 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0
4	1.8 \pm 1.3	3.4 \pm 1.1	1.4 \pm 0.5	0.2 \pm 0.4*
5	5.0 \pm 1.6	6.0 \pm 2.0	3.0 \pm 1.2*	1.8 \pm 0.4**
6	5.4 \pm 1.3	7.2 \pm 1.3	4.6 \pm 1.5	3.0 \pm 1.0*

** P<0.01, *P<0.05 (non-parametric Mann-Whitney test)

日 数	ラット 1 g G 投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)	抗マウス TNF- α 抗体投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)
3	0.8 \pm 0.4	1.0 \pm 0.6
4	2.4 \pm 0.2	1.0 \pm 0.5
5	5.8 \pm 0.4	3.2 \pm 0.5*
6	6.6 \pm 0.4	5.8 \pm 0.5

*P<0.05 (non-parametric Mann-Whitney test)

日 数	コントロール群	MTX 投与群 (投与量; 3.2 mg/kg)
3	1.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.4
4	1.8 \pm 0.6	1.8 \pm 0.7
5	4.0 \pm 0.9	6.0 \pm 0.6
6	5.2 \pm 0.9	6.0 \pm 0.6

【表7】

部 位	足 浮 腫 容 積 (mL)		
	ノーマル群	ウサギ1gG投与群 (投与量; 400 μ g/マウス)	M5投与群 (投与量; μ g/マウス)
前 足	0.041 \pm 0.003**	0.051 \pm 0.004	0.055 \pm 0.004 0.041 \pm 0.004** 0.038 \pm 0.001**
後 足	0.117 \pm 0.004**	0.138 \pm 0.005	0.140 \pm 0.010 0.127 \pm 0.006 0.121 \pm 0.009**

** P<0.01, *P<0.05 (one way ANOVA, Dunnett's test)

部 位	足 浮 腫 容 積 (mL)		
	ノーマル群	ラット1gG投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)	抗マウスTNF- α 抗体投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)
前 足	0.041 \pm 0.003**	0.044 \pm 0.003	0.041 \pm 0.002
後 足	0.117 \pm 0.004**	0.127 \pm 0.004	0.130 \pm 0.006

部 位	足 浮 腫 容 積 (mL)		
	ノーマル群	コントロール群	MTX投与群 (投与量; 3.2mg/kg)
前 足	0.041 \pm 0.003**	0.044 \pm 0.002	0.047 \pm 0.003
後 足	0.117 \pm 0.004**	0.129 \pm 0.005	0.132 \pm 0.003

【表8】

	体 重 変 化 (g)			
	ノーマル群	ウサギ1gG投与群 (投与量; 400 μ g/マウス)	M5投与群 (投与量; μ g/マウス)	
			40	150
投与0-3日	0.1	-2.8	-2.4	-1.6
投与3-6日	0.5	1.8	1.0	0.8
				1.5

	体 重 変 化 (g)		
	ノーマル群	ラット1gG投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)	抗マウスTNF- α 抗体投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)
投与0-3日	0.1	-2.9	-1.7
投与3-6日	0.5	-1.7	-0.1

	体 重 変 化 (g)		
	ノーマル群	コントロール群	MTX投与群 (投与量; 3.2 mg/kg)
投与0-3日	0.1	-2.9	-1.5
投与3-6日	0.5	-2.7	-1.8

【表9】

	摂餌量 (g/マウス/day)			
	ノーマル群	ウサギ1gG投与群 (投与量; 400 μ g/マウス)	M5投与群 (投与量; μ g/マウス)	
			40	150
投与0-3日	2.7	1.0	0.9	1.4
投与3-6日	2.9	2.4	2.3	2.4

	摂餌量 (g/マウス/day)		
	ノーマル群	ラット1gG投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)	抗マウスTNF- α 抗体投与群 (投与量; 200 μ g/マウス)
投与0-3日	2.7	1.0	1.3
投与3-6日	2.9	2.5	2.8

	摂餌量 (g/マウス/day)		
	ノーマル群	コントロール群	MTX投与群 (投与量; 3.2mg/kg)
投与0-3日	2.7	0.9	0.8
投与3-6日	2.9	2.4	2.1

実施例 21

OPN関連フラグメントペプチドの入手：

OPN関連フラグメントペプチドは、HPLCクロマトグラフィー精製した状態の品をオースペップ (Auspep Inc., Parkville, Australia) より購入した。それらのアミノ酸配列は、下記の (1) から (3) の通りである。

hOPN5 : CVDTYDGRGDSVVYGLRS

(C+V153からS169) (1)

hOPN3 : KSKKFRRPDIQYPDATDEC

(K170からE187+C) (2)

hOPN1 : IPVKQADSGSSEEEKQC

(I17からQ31+C) (3)

実施例 22

免疫用抗原の作製：

免疫原として、OPN関連フラグメントペプチドとサイログロブリンとの結合体をEMCS (N-(6-Maleimidocaproyloxy)-succinimide) 法により、以下のようにして作製した。なお、結合体を作るにあたり、サイログロブリンとOPN関連フラグメントペプチドとEMCSのモル比をそれぞれ1:300:400とした。

実施例21の各OPN関連フラグメントペプチド4mgを、それぞれ約1mlの蒸留水に溶解した。一方、1mlの0.01Mリン酸バッファー (pH7.0) に5mgのサイログロブリンを溶解したものと、ジメチルホルムアミドで溶解したEMCS 80 μ g/ μ lとをそれぞれ上述モル相当量になるように混合し、サイログロブリン-EMCS複合体溶液を作製した。この複合体溶液を3つに分け、その各々に上記OPN関連フラグメントペプチド溶液を上述モル相当量加えることにより、EMCSで架橋されたOPN関連フラグメントペプチドとサイクログロブリンとの結合体溶液を作製した。

この結合体溶液を、PBSを用いて透析し、結合体として $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように濃度調製した。このようにして得られたOPN関連フラグメントペプチドとサイログロブリンとの結合体を免疫用抗原として用いた。

5 実施例 23

スクリーニング用抗原の作製：

スクリーニング用OPNタンパク質として、GSTとヒトOPNアイソフォームとの融合蛋白であるGST-OPN-a、GST-OPN-b、GST-OPN-c、トロンビン開裂部位よりアミノ基側のOPNフラグメント（GST-Nhalf）、及びカルボキシル基側のOPNフラグメント（GST-Chalf）は、それぞれ実施例1に述べた方法により調製し、抗血清のOPNに対する反応性に用いた。

15 実施例 24

免疫感作：

免疫用抗原として、実施例22において得られたOPN関連フラグメントペプチドとサイログロブリンとの結合体を用い、ウサギに免疫を行った。免疫は、1週間、または2週間おきに結合体溶液 $100 \mu\text{l}$ （ $100 \mu\text{g}$ ）を投与することにより行った。抗原は初回免疫のみにフロイント完全アジュバントと混和し、二回目からはフロイント不完全アジュバントと混和した。8回免疫後、採血を行い、血清を分離しこれを抗血清とした。

20 実施例 25

抗血清のOPNに対する反応性：

25 実施例21で調製したOPN関連フラグメントペプチドを $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように0.1M炭酸バッファー（pH9.5）に希釈し、 $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ にて96ウェルプレートに固相した。PBSにて洗浄、0.1%BSA/PBS/0.05% NaN_3 溶液でブロッキングした後、実施例24で得た抗

血清の100倍希釈液を順次2倍希釈し、ウェルに50 μ l入れ、37℃にて30分間反応させた。

反応終了後、0.05% Tween 20-PBSにて4回洗浄後、HRP標識抗ウサギIgG (IBL社)を50 μ lずつ各ウェルに添加し、37℃で30分反応させた。反応終了後、0.4mg/ml オルトフェニレンジアミン (OPD) と0.03%過酸化水素水を含む0.05Mクエン酸緩衝液 (pH 4.5) を100 μ lずつ各ウェルにいれ、室温で15分間遮光状態で放置し、発色させた。発色後、1N硫酸100 μ lを各ウェルに加え、反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。

一方、実施例23で調製したOPNタンパク質を用いて、ウエスタンブロット法にて抗血清の反応性を調べた。その結果、OPN関連フラグメントペプチドhOPN1およびhOPN5に対する抗血清は、GST-OPN-a, GST-OPN-b, GST-OPN-cおよびGST-Nhalfに反応するが、GST-Chalfには反応しなかった。一方、OPN関連フラグメントペプチドhOPN3に対する抗血清は、GST-OPN-a, GST-OPN-b, GST-OPN-cおよびGST-Chalfに反応するが、GST-Nhalfには反応しなかった。

実施例 26

抗OPN関連フラグメントペプチド抗体とHRPとの結合体作製：

OPN関連フラグメントペプチドhOPN3とhOPN1に対する抗体とHRPとの結合体作製は以下のように作製した。各抗OPN関連フラグメントペプチド抗体20mgをペプシン消化し、ゲル濾過することにより抗OPN関連フラグメントペプチド抗体のF(ab')₂フラグメントを精製し、2-メルカプトエタノールを用いることによりF(ab')₂フラグメントをFab'フラグメントに還元した。HRPとEMCSとを、37℃で60分反応させ、ゲル濾過することによりHRP-EMCS結合体を作製し、さらにこれと抗OP

N関連フラグメントペプチド抗体Fab'フラグメントとを4℃で一晩反応させ、ゲル濾過することによりEMCS架橋による抗OPN関連フラグメントペプチド抗体とHRPとの結合体を作製した。

5 実施例 27

サンドイッチELISA系の構築：

サンドイッチELISA用プレートと標識抗体の組合せで1-3、5-1の2種類の系を作製した。このうち、1-3系は以下のように作製した。10μg/mlのOPN関連フラグメントペプチドhOPN1に対する抗体を100μlずつ96well ELISA用プレートに加えた。4℃一晩反応させた後、10%BSA/PBS/NaN₃溶液にてブロッキングを行い、この状態をサンドイッチELISA用プレートとした。実施例26で作製したOPN関連フラグメントペプチドhOPN3に対する抗体とHRPとの結合抗体を標識抗体とした。このようにhOPN1に対する抗体を用いた固相プレートとhOPN3に対する抗体を用いた標識抗体の組合せを1-3系とした。

同様に、hOPN5に対する抗体を用いた固相プレートと、hOPN1に対する抗体を用いた標識抗体の組合せを5-1系として構築した。

実施例 28

20 サンドイッチELISA系による被験者におけるオステオポンチンの測定：

OPNタンパク質の測定は以下のように行った。1-3系及び5-1系のサンドイッチELISA用プレートに被験者から採取した血漿および関節腔液サンプルを含む溶液を100μl加え、37℃で一時間反応させた。反応後、0.05%Tween 20-PBSで4回洗浄、それぞれの系に特異的な標識抗体を100μl加え、4℃で30分反応させた。反応後、0.05%Tween 20-PBSで6回洗浄し、TMB (Tetramethyl benzidine) 溶液を100μl加え、室温、遮光下30分放置した。1N硫酸で反

応を止め、吸光度450nmで測定した。

上記の方法により測定したリウマチ患者関節腔液（13例）のOPN値を表10に、変形性関節症患者関節腔液（12例）のOPN値を表11に示す。また、リウマチ患者血漿（16例）のOPN値を表12に、変形性関節症患者血漿（7例）のOPN値を表13に、正常人血漿（6例）のOPN値を表14に示す。

これらの結果から明らかなように、血漿中OPN値との比較において、1-3の系では、リウマチ性関節炎患者、変形性関節症患者および健常人間で、有意差は認められなかった。しかしながら、5-1の系では、リウマチ性関節炎患者、変形性関節症患者ともに健常人との比較において、その測定値は有意に高く、その程度はリウマチ性関節炎患者に優位であった。このことは、5-1の系が反映する総OPN量が関節炎全般における診断の有効性を示唆するものである。

一方、リウマチ性関節炎患者および変形性関節症患者の関節腔液のOPN値は、血漿におけるOPN値と比較して上昇しており、局所でのOPN産生が強く示唆された。

また、関節腔液中OPN値のリウマチ性関節炎患者、変形性関節症患者間での比較において、1-3および5-1のいずれの系でも、リウマチ性関節炎患者は、変形性関節症患者と比較し、OPN値が有意に高かった。

さらに新しい指標として1-3系/5-1系のOPN値比の検討を行った。この指標は、トロンビン開裂OPNの割合を比較することができる。リウマチ性関節炎患者の血漿および関節腔液のOPN値は1以下、変形性関節症患者では2以上となり、有意差が認められた。したがって、1-3系/5-1系のOPN値を利用することにより、リウマチ患者と変形性関節症患者を区別することが可能となる早期の検査方法として利用できる。

【表10】

検 体	1-3系 (ng/ml)	5-1系 (ng/ml)	1-3系 / 5-1系
RA 1	8498	2932	2.898
RA 2	22715	26223	0.866
RA 3	2659	1905	1.396
RA 4	20186	94430	0.214
RA 5	1520	2002	0.759
RA 6	5870	2238	2.623
RA 7	7303	56753	0.129
RA 8	2200	6268	0.351
RA 9	18344	59873	0.306
RA10	2133	2002	1.065
RA11	26804	33036	0.811
RA12	18868	32824	0.575
RA13	3633	6067	0.599
平 均	10825.6	25119.5	0.969

【表11】

検 体	1-3系 (ng/ml)	5-1系 (ng/ml)	1-3系 / 5-1系
OA 1	1520	3471	0.438
OA 2	9957	14374	0.693
OA 3	6595	2932	2.249
OA 4	3523	237	14.865
OA 5	8619	28483	0.303
OA 6	1926	896	2.150
OA 7	653	850	0.768
OA 8	6490	7814	0.831
OA 9	4750	1987	2.391
OA10	6830	2932	2.329
OA11	386	181	2.133
OA12	1621	356	4.553
平 均	4405.8	5376.1	2.808

【表 12】

検 体	1-3系 (ng/ml)	5-1系 (ng/ml)	1-3系 / 5-1系
RA 1	1621	1379	1.175
RA 2	532	845	0.630
RA 3	132	617	0.214
RA 4	142	1758	0.081
RA 5	624	2089	0.299
RA 6	341	1990	0.171
RA 7	152	845	0.180
RA 8	671	224	2.996
RA 9	543	557	0.975
RA10	947	431	2.197
RA11	935	1794	0.521
RA12	1008	1650	0.611
RA13	636	678	0.938
RA14	464	545	0.851
RA15	683	488	1.400
RA16	1057	597	1.771
平 均	6555	1030.4	0.938

【表13】

検体	1-3系 (ng/ml)	5-1系 (ng/ml)	1-3系 /5-1系
OA 1	695	302	2.301
OA 2	1094	412	2.655
OA 3	1070	557	1.921
OA 4	75	1129	0.066
OA 5	814	356	2.286
OA 6	959	276	3.475
OA 7	983	311	3.161
平均	812.9	477.6	2.267

【表14】

検体	1-3系 (ng/ml)	5-1系 (ng/ml)	1-3系 /5-1系
健康人 1	475	199	2.387
健康人 2	578	249	2.321
健康人 3	802	232	3.457
健康人 4	983	384	2.560
健康人 5	520	284	1.831
健康人 6	624	215	2.902
平均	663.7	260.5	2.576

請 求 の 範 囲

1. R G D配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害し、かつ、S V V Y G L R配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害する抗オステオポンチン抗体または当該抗体に起因する抗体断片。
5
2. 部分アミノ酸配列としてR G D S V V Y G L R Sを含むペプチドを抗原として得られたものである請求項第1項記載の抗オステオポンチン抗体。
3. ペプチドV D T Y D G R G D S V V Y G L R Sを抗原として得られたものである請求項第1項または第2項記載の抗オステオポンチン抗体。
10
4. モノクローナル抗体である請求項第1項ないし請求項第3項の何れかに記載の抗オステオポンチン抗体。
5. キメラ抗体である請求項第1項ないし請求項第3項の何れかに記載の抗オステオポンチン抗体。
- 15 6. 下記の重鎖（a）および軽鎖（b）を有する請求項第5項記載の抗オステオポンチン抗体。
（a）マウス由来の重鎖可変領域およびヒト由来の重鎖定常領域を有する重鎖
（b）マウス由来の軽鎖可変領域およびヒト由来の軽鎖定常領域を有する軽鎖
7. 重鎖（a）のマウス由来の重鎖可変領域が、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項第5項または第6項記載の抗オステオポンチン抗体。
20
8. 軽鎖（b）のマウス由来の軽鎖可変領域が、配列番号20に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項第5項または第6項記載の抗オステオポンチン抗体。
- 25 9. 重鎖（a）の重鎖定常領域が、ヒト I g γ 1である請求項第5項または第6項記載の抗オステオポンチン抗体。
10. 軽鎖（b）の軽鎖定常領域が、ヒト I g κ である請求項第5項または第6項記載の抗オステオポンチン抗体。

1 1. ヒト化抗体である請求項第 1 項ないし請求項第 3 項の何れかに記載の抗オステオポンチン抗体。

1 2. 下記の重鎖 (c) および軽鎖 (d) を有する請求項第 1 1 項記載の抗オステオポンチン抗体。

5 (c) マウス由来の重鎖可変領域の相補性決定領域およびヒト由来の重鎖可変領域のフレームワーク領域を有する重鎖可変領域ならびにヒト由来の重鎖定常領域を有する重鎖

(d) マウス由来の軽鎖可変領域の相補性決定領域およびヒト由来の軽鎖可変領域のフレームワーク領域を有する軽鎖可変領域ならびにヒト由来の軽鎖定常領域を有する軽鎖
10

1 3. 重鎖 (c) のマウス由来の重鎖可変領域の相補性決定領域が、配列番号 2 1 ~ 2 3 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする請求項第 1 1 項または第 1 2 項記載の抗オステオポンチン抗体。

1 4. 軽鎖 (d) のマウス由来の軽鎖可変領域の相補性決定領域が、配列番号 2 4 ~ 2 6 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする請求項第 1 1 項または第 1 2 項記載の抗オステオポンチン抗体。
15

1 5. 重鎖 (c) の重鎖可変領域が、配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする請求項第 1 1 項または第 1 2 項記載の抗オステオポンチン抗体。

1 6. 軽鎖 (d) の軽鎖可変領域が、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする請求項第 1 1 項または第 1 2 項記載の抗オステオポンチン抗体。
20

1 7. 重鎖 (c) の重鎖定常領域が、ヒト Ig γ 1 である請求項第 1 1 項または第 1 2 項記載の抗オステオポンチン抗体。

1 8. 軽鎖 (d) の軽鎖定常領域が、ヒト Ig κ である請求項第 1 1 項または第 1 2 項記載の抗オステオポンチン抗体。
25

1 9. 配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。

2 0. 配列番号 2 0 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。

21. 配列番号28に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。
22. 配列番号30に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列。
23. 請求項第19項に記載の塩基配列とヒトIg γ 1遺伝子とを有するベクター。
- 5 24. 請求項第20項に記載の塩基配列とヒトIg κ 遺伝子とを有するベクター。
25. 請求項第21項に記載の塩基配列とヒトIg γ 1遺伝子とを有するベクター。
- 10 26. 請求項第22項に記載の塩基配列とヒトIg κ 遺伝子とを有するベクター。
27. 請求項第23項および請求項第24項に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
28. 請求項第25項および請求項第26項に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
- 15 29. 請求項第5項または第6項記載の抗オステオポンチンキメラ抗体の製造方法であって、請求項第27項記載の宿主細胞を培養し、培養液から抗オステオポンチンキメラ抗体を採取することを特徴とする抗オステオポンチンキメラ抗体の製造方法。
- 20 30. 請求項第11項または第12項に記載の抗オステオポンチンヒト化抗体の製造方法であって、請求項第28項記載の宿主細胞を培養し、培養液から抗オステオポンチンヒト化抗体を採取することを特徴とする抗オステオポンチンヒト化抗体の製造方法。
- 25 31. 請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含む自己免疫疾患治療剤。
32. 請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含むリウマチ治療剤。

33. 請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含むリウマチ性関節炎の治療剤。

5 34. 請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を有効成分として含む変形性関節症の治療剤。

35. 自己免疫疾患患者に、請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

10 36. リウマチ患者に、請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を投与することを特徴とするリウマチ性関節炎の治療方法。

15 37. リウマチ性関節炎患者に、請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を投与することを特徴とするリウマチの治療方法。

38. 変形性関節症患者に、請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片を投与することを特徴とする変形性関節症の治療方法。

20 39. 自己免疫疾患治療剤製造のための請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片の使用。

40. リウマチ治療剤製造のための請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片の使用。

25 41. リウマチ性関節炎の治療剤製造のための請求項第1項ないし第6項または第11項もしくは第12項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片の使用。

42. 変形性関節症の治療剤製造のための請求項第1項ないし第6項または

第 1 1 項もしくは第 1 2 項の何れかに記載の抗体または当該抗体に起因する抗体断片の使用。

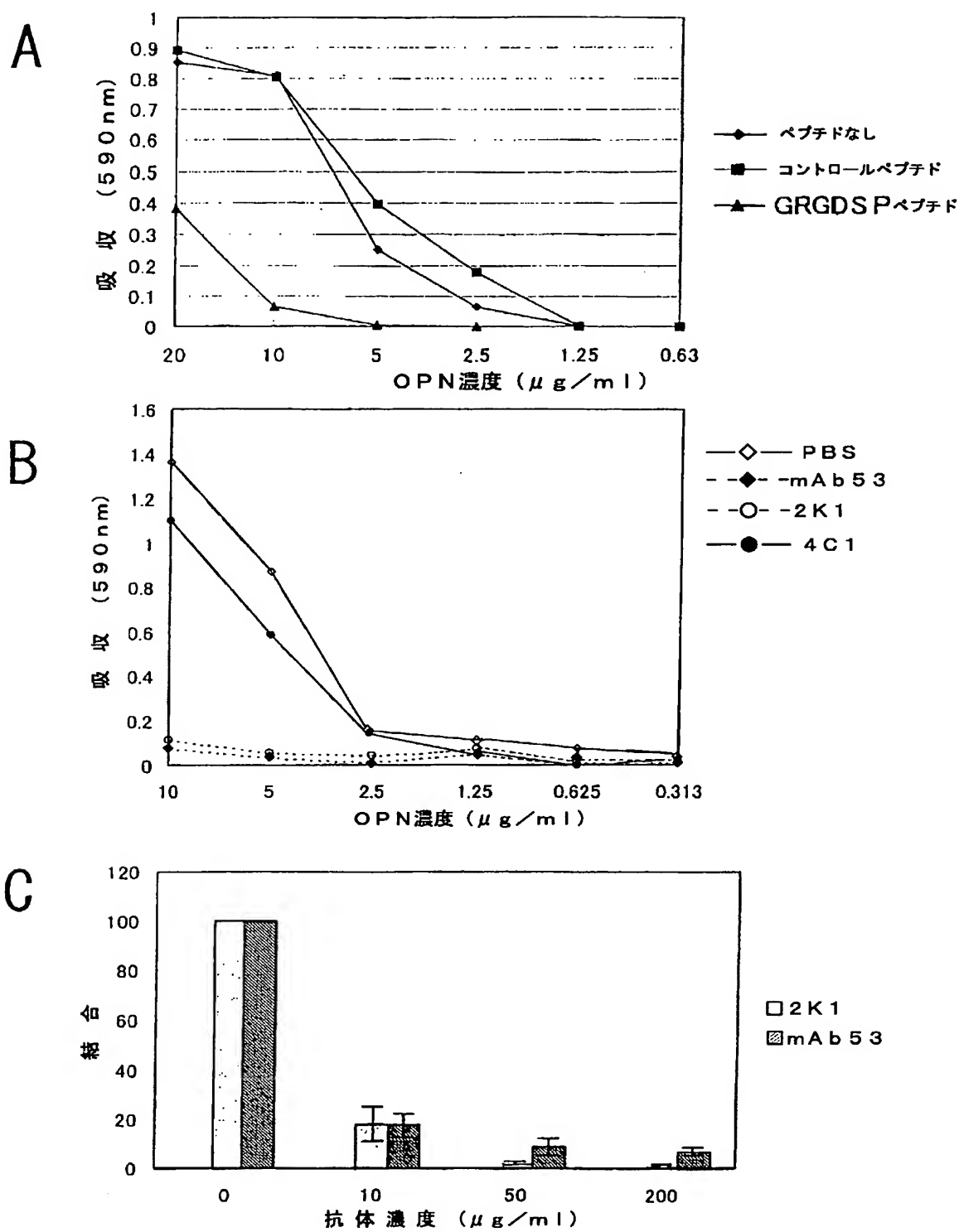
5 4 3. 被検化合物の、オステオポンチンの R G D 配列とインテグリンの結合および／または、S V V Y G L R 配列とインテグリンとの結合の阻害程度を評価することを特徴とする自己免疫疾患治療剤のスクリーニング方法。

4 4. 被検化合物の、オステオポンチンの R G D 配列とインテグリンの結合および／または、S V V Y G L R 配列とインテグリンとの結合の阻害程度を評価することを特徴とするリウマチ治療剤のスクリーニング方法。

10 4 5. 被検化合物の、オステオポンチンの R G D 配列とインテグリンの結合および／または、S V V Y G L R 配列とインテグリンとの結合の阻害程度を評価することを特徴とするリウマチ性関節炎治療剤のスクリーニング方法。

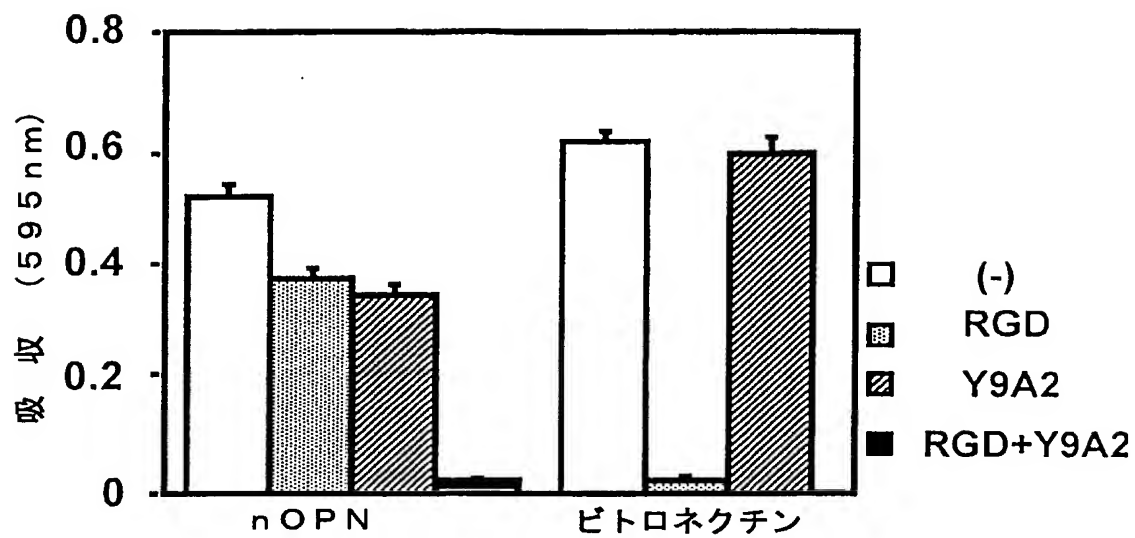
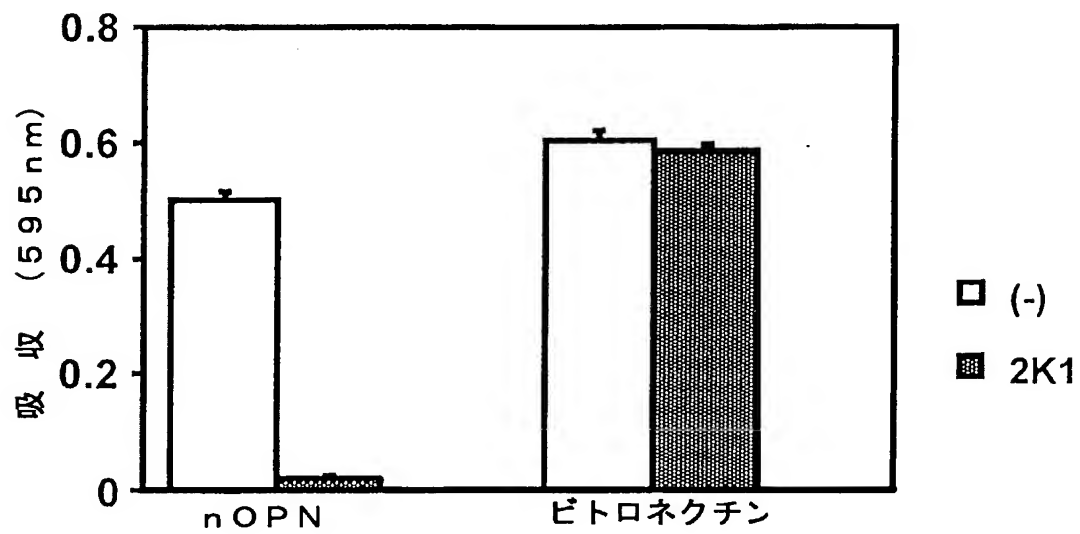
- 1/17 -

第1図



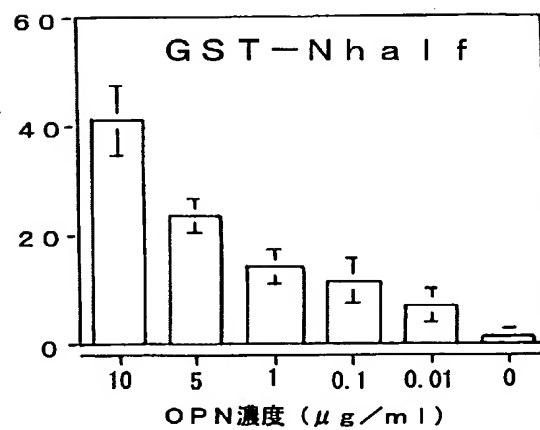
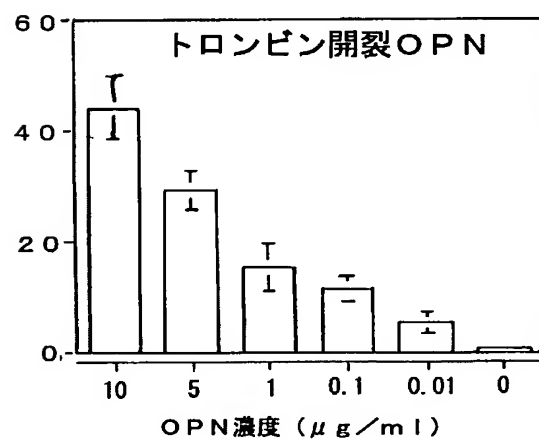
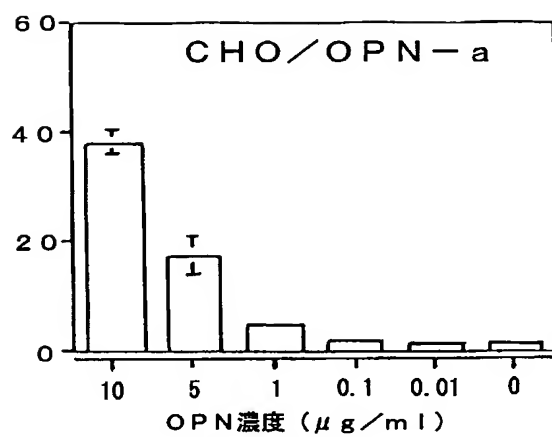
- 2/17 -

第2図

A**B**

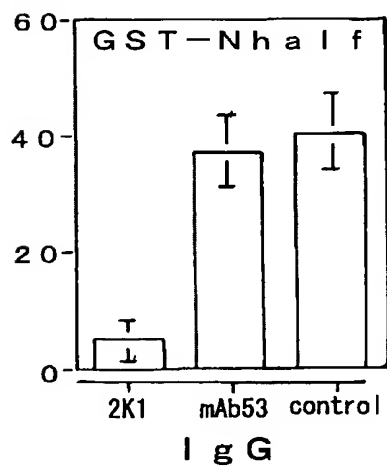
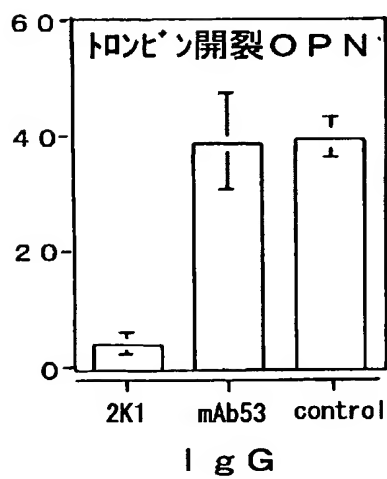
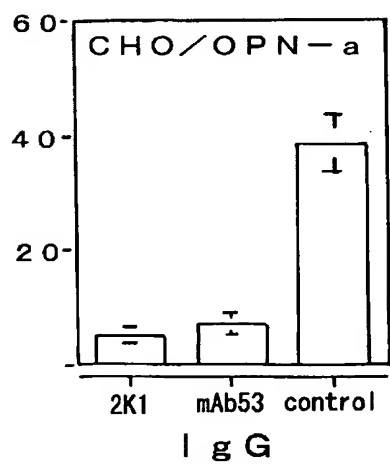
- 3/17 -

第3a図



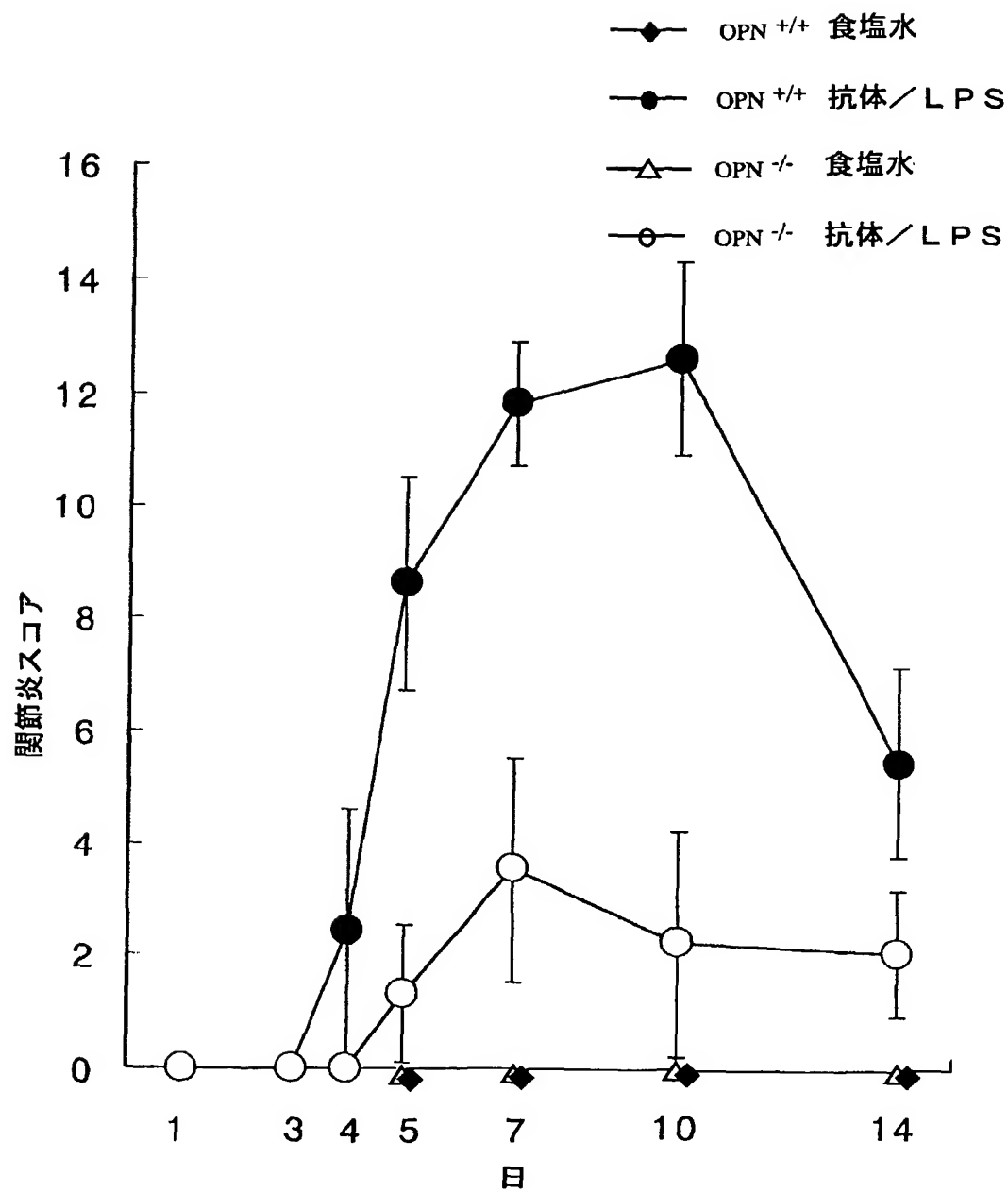
- 4/17 -

第3b図



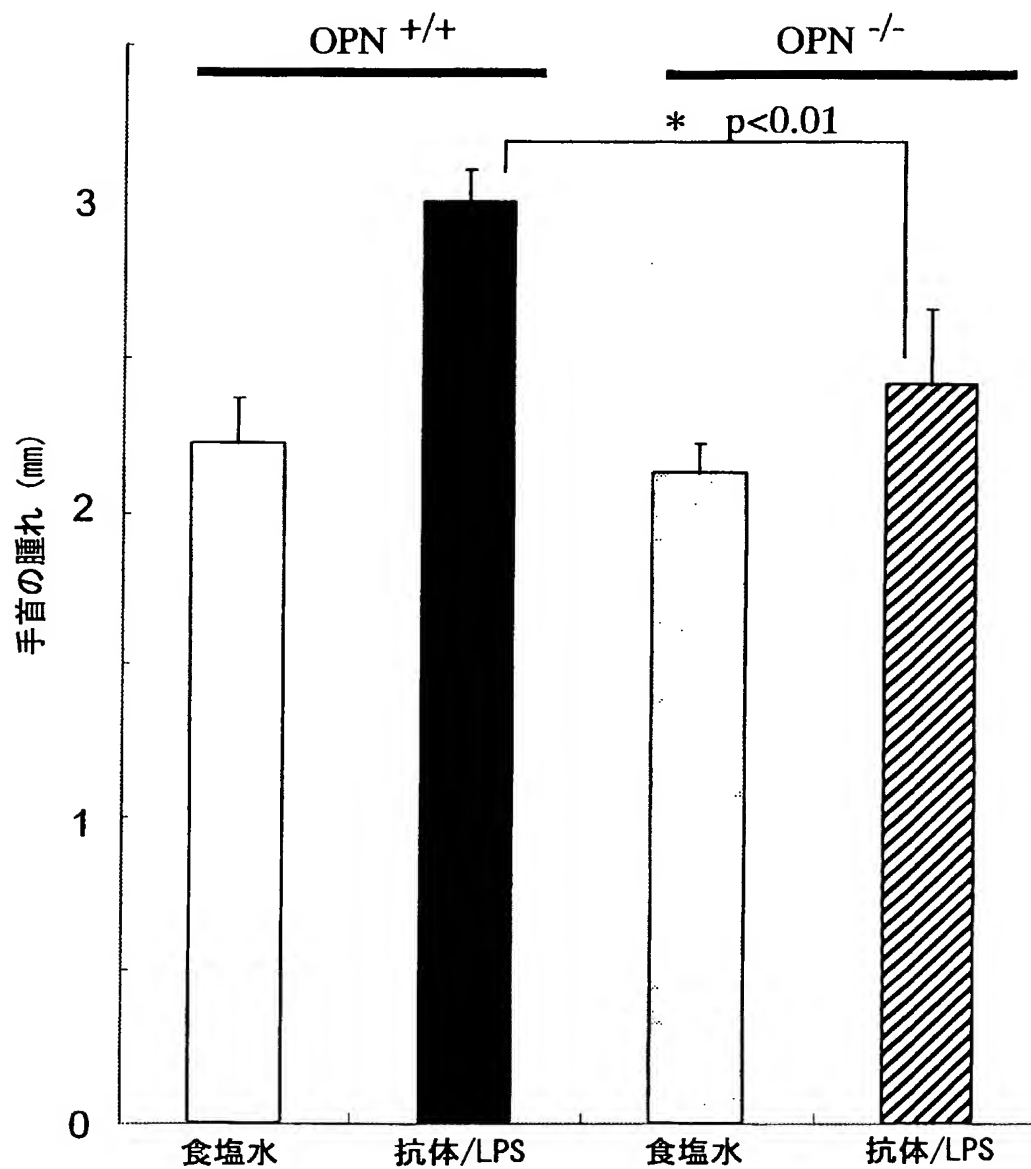
- 5/17 -

第4図



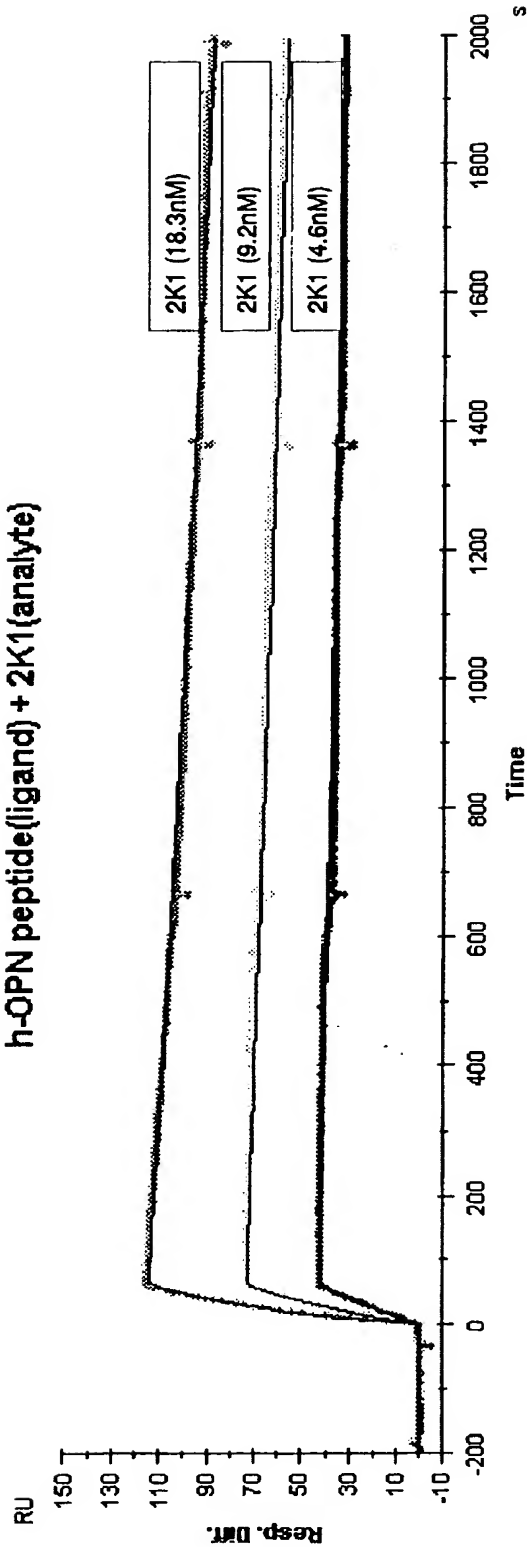
- 6/17 -

第5図

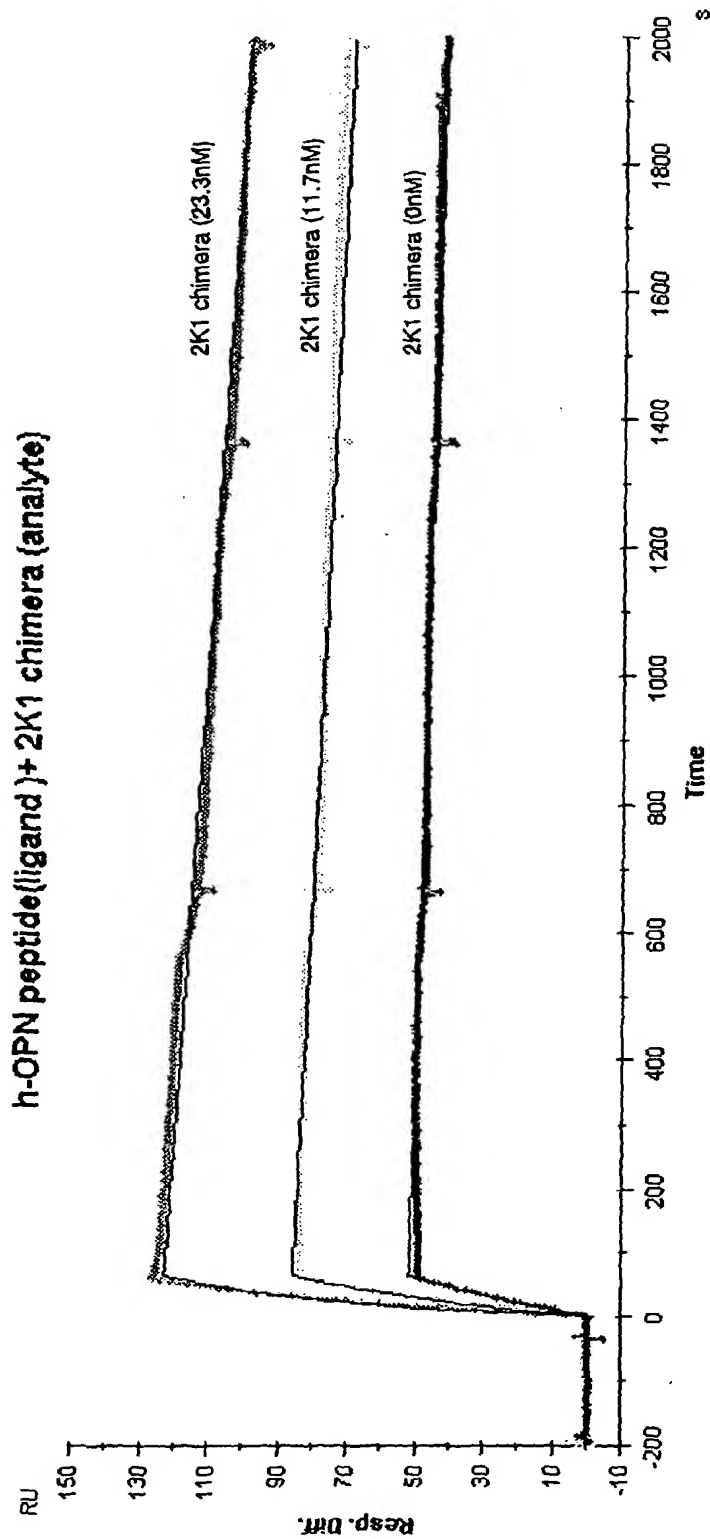


- 7/17 -

第6 a 図



第 6 b 図



- 9/17 -

第 7 図

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
	10	30	40	50	60
2K1-VH	QVQLQQSGAE	LVRPGASVKL	SCKALGYTFT	DYEMHWVKQT	PVHGLEWIGA IHPGRGGTAY
DP-88	QVQLVQSGAE	vkPGsSVKv	SCKAsGgTFs	sYaisWVrQa	PgqGLEWmGg IiPiFGtanY

	FR3	CDR3	FR4
	70	80	90
2K1-VH	NQKFKGKATL	TADKSSSTAY	MELSSLTSED SAVYYCTRIT GYF--DVWGAGT TVTVSS
DP-88	αQKFqGrvTI	TADKStSTAY	MELSSLrSED tAVYYCaRyy <u>YygmDVWGgGT TVTVSS</u>

JH 6

- 11/17 -

第9図

10	20	30	40	50	60
<u>CACGAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGCGCGTGTTTTGCCTGCTCGCCGTGGC</u>					
HindIII M D W T W R V F C L L A V A					
70	80	90	100	110	120
<u>TCCTGGGGCCACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG</u>					
P G A H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G					
130	140	150	160	170	180
GTCCTCCGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGTACCTTCAGCGACTATGAAATGCA					
S S V K V S C K A S G G T F S D Y E M H					
190	200	210	220	230	240
CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGCTATTCATCCAGGAAG					
W V R Q A P G Q G L E W M G A I H P G R					
250	260	270	280	290	300
AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATC					
G G T A Y N Q K F K G R V T I T A D K S					
310	320	330	340	350	360
CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA					
T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y					
370	380	390	400	410	420
CTGTGCGAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC					
C A R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S					
430	440				
CTCAGGTGAGTGGATCCGCGA					
S	BamHI				

- 12/17 -

第 1 0 図

10	20	30	40	50	60
<u>CACGAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGC</u>					
HindIII M G W S C I I L F L V A T A					
70	80	90	100	110	120
<u>TACAGGTGTCCACTCCGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCTCACCCCT</u>					
T G V H S D V V M T Q S P L S L P V T L					
130	140	150	160	170	180
TGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGAGCTCTCAAAGCATTGTACATAGTAATGGAAA					
G Q P A S I S C R S S Q S I V H S N G N					
190	200	210	220	230	240
CACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAA					
T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K					
250	260	270	280	290	300
AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGA					
V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D					
310	320	330	340	350	360
TTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTTGAAGCTGAAGACGTCGGAGTTTATTACTGCTTTCA					
F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q					
370	380	390	400	410	420
AGGTTACATGTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTA					
G S H V P L T F G Q G T K L E I K R					
430	440	450			
GAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCCGCGA					
BamHI					

- 13/17 -

第 1 1 図

```

10      20      30      40      50      60
5'-CACGAAGCTT GCGGCCACCA TGGACTGGAC CTGGCGCGTG TTTTGCCCTGC TCGCCGTGGC

70      80      90      100     110     120
TCCTGGGGCC CACAGCCAGG TGCAGCTGGT GCAGTCT-3'

3'-ACGTCGACCA CGTCAGACCC CGACTCCACT TCTTCGGACC

130     140     150     160     170     180
CAGGAGGCAC TTCCAGAGGA CGTTCCGAAG ACCTCCATGG AAGTCGCT-5'

5'-TTC TGGAGGTACC TTCAGCGACT ATGAAATGCA

190     200     210     220     230     240
CTGGGTGCGA CAGGCCCTTG GACAAGGGCT TGAGTGGATG GGAGCTATTC ATCCAGGAAG

3'-G TAGGTCCTTC

250     260     270     280     290     300
AGGTGGTACT-3'

TCCACCATGA CGGATGTTAG TCTTCAAGTT CCCGTCTCAG TGCTAATGGC GCCTGTTTAG

5'-TC

310     320     330     340     350     360
GTGATCATGT CGGATGTAC-5'

CACTAGTACA GCCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA

370     380     390     400     410     420
CTGTGCGAGA ATTACTGGGT ACTTCGATGT CTG-3'

3'-ATGACCCA TGAAGCTACA GACCCCCGTT CCCTGGTGCC AGTGGCAGAG

430     440
GAGTCCACTC ACCTAGGCGC T-5'

```

- 14/17 -

第 1 2 図

```

10      20      30      40      50      60
5'-CACGAAGCTT GCGGCCACCA TGGGATGGAG CTGTATCATC CTCTTCTTGG TAGCAACAGC

70      80      90      100     110     120
TACAGGTGTC CACTCCGATG TT-3'
3'-TGTCACAG GTGAGGCTAC AACACTACTG AGTCAGAGGT GAGAGGGACG GGCAGTGGGA

130     140     150     160     170     180
ACCTGTCGCG CCGAGGTAGA GGACGTCCTC GAGAGTTTCG TAA-5'
5'-TGCAGGAG CTCTCAAAGC ATTGTACATA GTAATGGAAA

190     200     210     220     230     240
CACCTATTG GAATGGTACC TGCAGAAGCC AGGGCAGTCT CCACAGCTCC TGATCTATAA
AGTTTCCAAC CGATT-3'
TCAAAGGTTG GCTAAAGAC CCCAGGGTCT GTCTAAGTCG CCGTCACCCA GTCCGTGACT

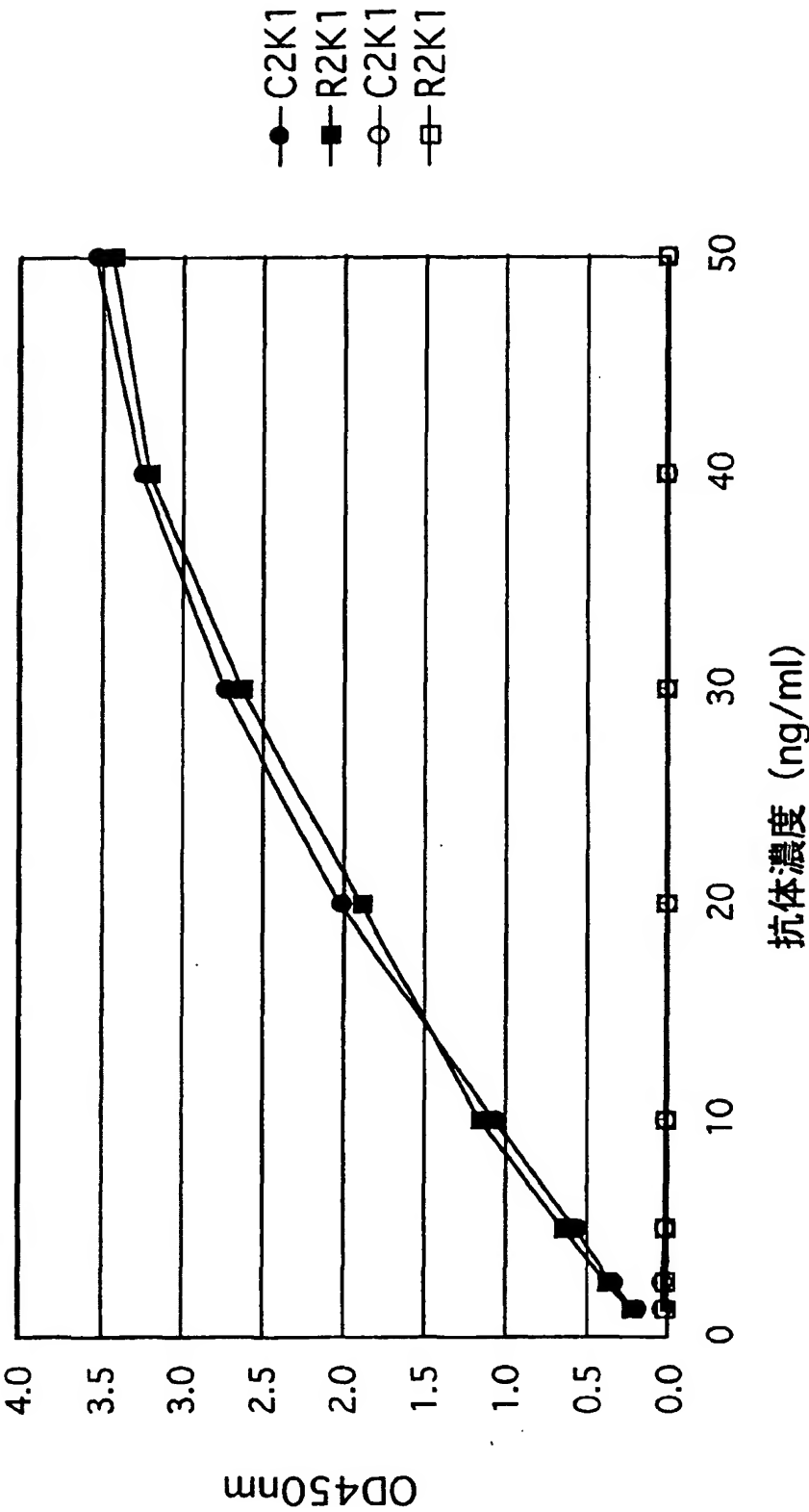
310     320     330     340     350     360
AAAGTGTGAC TTTTAGTCGT CCCAACTTCG ACTTCTGCAG CCT-5'
5'-GTTGAAGC TGAAGACGTC GGAGTTTATT ACTGCTTTCA

370     380     390     400     410     420
AGGTTACAT GTTCCGCTCA CGTTTG-3'
3'-GTGTA CAAGGCGAGT GCAAACCGGT CCCCTGGTTC GACCTCTAGT TTGCACTCAT

430     440     450
CTTAAATTG AACGAAGGA GTCAACCTAG GCGCT-5'

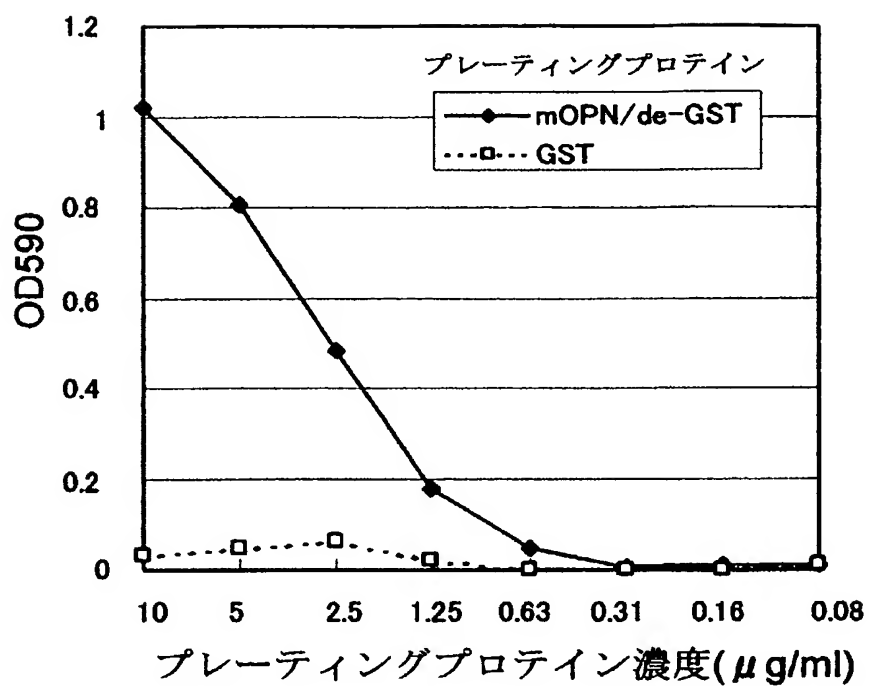
```


第 1 3 図

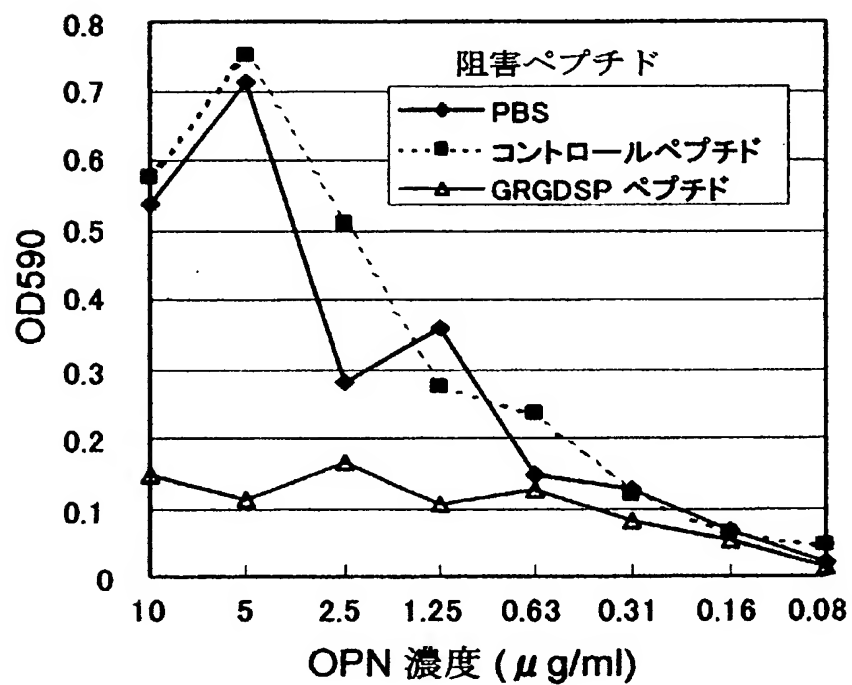


- 16/17 -

第 1 4 図

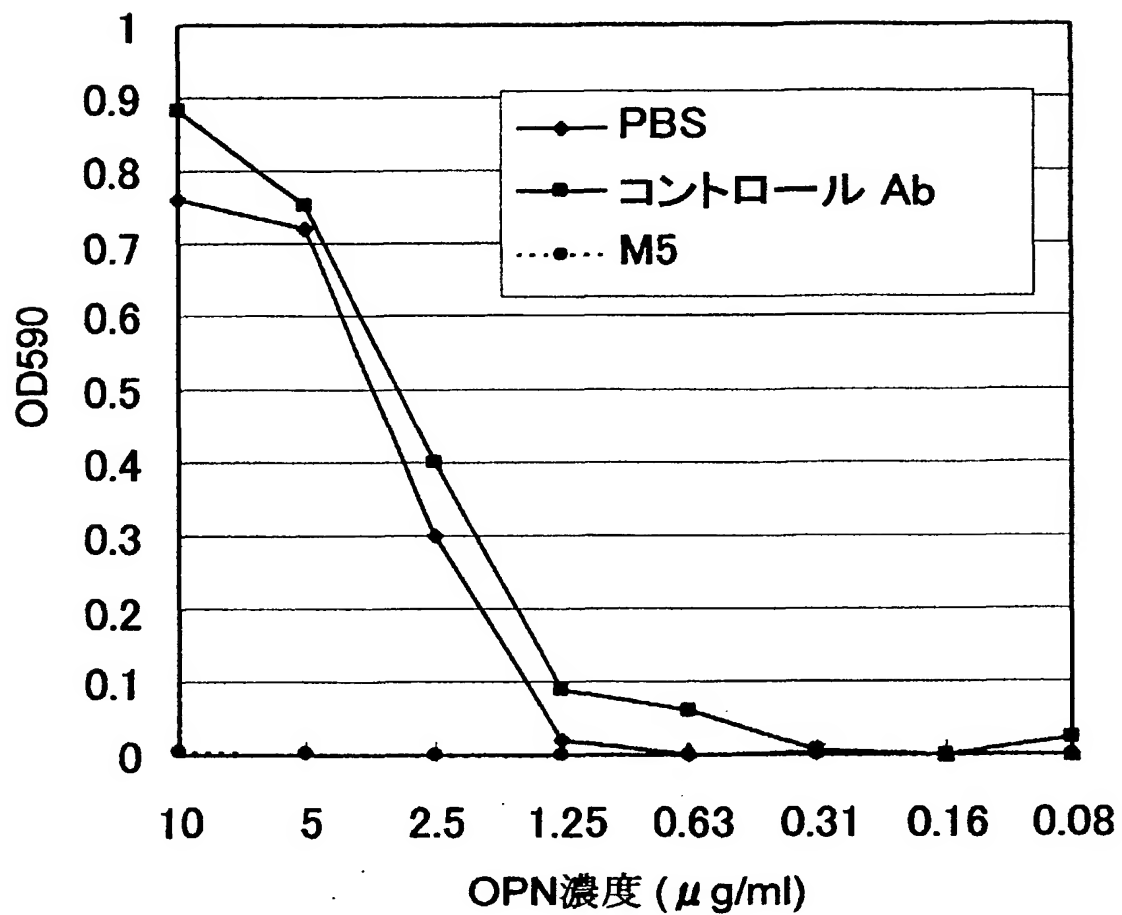


第 1 5 図



- 17/17 -

第 1 6 図



SEQUENCE LISTING

<110> Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.
Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Recombinant anti-osteopontin antibody and use thereof

<130> PF-020016-W0

<140>
<141>

<150> JP 2001-290700
<151> 2001-09-25

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Inventor: UEDE, Toshimitsu; KON, Shigeyuki;
YAMAMOTO, Nobuchika; HIGUCHI, Hirofumi; TORIKAI,
Masaharu; TOKIEDA, Yoshiyuki; NAKASHIMA,
Toshihiro; MAEDA, Hiroaki

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: (1) hOPN5

<400> 1
Cys Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5 10 15
Arg Ser

<210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: (2) hOPN3

- 2/19 -

<400> 2

Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr
1 5 10 15

Asp Glu Cys

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:(3)hOPN1

<400> 3

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Cys
1 5 10 15

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:OPN-5

<400> 4

cgggatccac taccatgaga attgcagtga ttgtgc 35

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:OPN-3

<400> 5

ccgctcgagt taattgacct cagaagatgc actatc 36

<210> 6

<211> 37

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:OPNct-3

<400> 6
acacagcatt cttttccaca gaacttccag aatcagc 37

<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:OPNct-5

<400> 7
tgaggaaaag aatgctgtgt cctctgaaga aaacc 35

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:OPNnh-3

<400> 8
gcctcgagtt acctcagtc ataaaccaca ct 32

<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:OPNch-3

<400> 9
tcttagattt ggcacagggtg atgcctagga g 31

<210> 10
<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:OPNch-5

<400> 10

cacctgtgcc aaatctaaga agtttcgcag a

31

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide1

<400> 11

Cys	Val	Asp	Thr	Tyr	Asp	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Val	Val	Tyr	Gly	Leu
1				5				10						15	

Arg Ser

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide2

<400> 12

Cys	Ile	Asp	Ser	Gln	Glu	Leu	Ser	Lys	Val	Ser	Arg	Glu	Phe	His	Ser
1				5				10						15	

His

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

- 5/19 -

<223> Description of Artificial Sequence:M5peptide

<400> 13

Cys	Val	Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Leu
1				5				10						15	

Arg

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fragment
peptide

<400> 14

Ser	Val	Val	Tyr	Gly	Arg	Leu
1				5		

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fragment
peptide

<400> 15

Arg	Gly	Asp	Ser	Val	Val	Tyr	Gly	Leu	Arg	Ser
1				5				10		

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fragment
peptide

<400> 16

- 6/19 -

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5 10 15

Ser

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fragment
peptide

<400> 17

Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fragment
peptide

<400> 18

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10 15

Ser

<210> 19

<211> 116

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<223> mouse antibody 2K1 VH region

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

- 7/19 -

1		5		10		15									
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Leu	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
		20						25					30		
Glu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Val	His	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Ala	Ile	His	Pro	Gly	Arg	Gly	Gly	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Ile	Thr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val
		100						105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
		115													

<210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> mouse

<220>
 <223> mouse antibody 2K1 VL region

<400> 20
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

- 8/19 -

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> mouse

<220>
 <223> CDR1 (VH)

<400> 21
 Asp Tyr Glu Met His
 1 5

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> mouse

<220>
 <223> CDR2 (VH)

<400> 22
 Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> mouse

<220>
 <223> CDR3 (VH)

<400> 23

- 9/19 -

Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> mouse

<220>
<223> CDR1(VL)

<400> 24
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> mouse

<220>
<223> CDR2(VL)

<400> 25
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> mouse

<220>
<223> CDR3(VL)

<400> 26
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 27
<211> 441
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

- 10/19 -

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Human antibody
2K1 VH region

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(424)

<400> 27

```

cacgaagctt gccgccacc atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc 52
                Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu
                  1                      5                      10

gcc gtg gct cct ggg gcc cac agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg 100
Ala Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
              15                      20                      25

gct gag gtg aag aag cct ggg tcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct 148
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
              30                      35                      40

tct gga ggt acc ttc agc gac tat gaa atg cac tgg gtg cga cag gcc 196
Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala
              45                      50                      55

cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga gct att cat cca gga aga ggt 244
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly
              60                      65                      70                      75

ggt act gcc tac aat cag aag ttc aag ggc aga gtc acg att acc gcg 292
Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
              80                      85                      90

gac aaa tcc act agt aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct 340
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
              95                      100                      105

gag gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg aga att act ggg tac ttc gat 388
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp
              110                      115                      120

gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 434
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
              125                      130                      135

tccgcga 441

```

- 11/19 -

<210> 28
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence:Human antibody
 2K1 VH region

<400> 28
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 29
 <211> 455
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Human antibody
 2K1 VL region

<220>
 <221> CDS

- 12/19 -

<222> (20)..(415)

<400> 29

```

cacgaagctt gccgccacc atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta 52
                Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val
                  1                      5                      10

gca aca gct aca ggt gtc cac tcc gat gtt gtg atg act cag tct cca 100
Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
                  15                      20                      25

ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg 148
Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
                  30                      35                      40

agc tct caa agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg gaa tgg 196
Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp
                  45                      50                      55

tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt 244
Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val
                  60                      65                      70                      75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac aga ttc agc ggc agt ggg tca 292
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
                  80                      85                      90

ggc act gat ttc aca ctg aaa atc agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc 340
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
                  95                      100                      105

gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc 388
Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly
                  110                      115                      120

cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gagtagaatt taaactttgc 435
Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
                  125                      130

ttcctcagtt ggatccgcga 455

```

<210> 30

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Human antibody
2K1 VL region

- 13/19 -

<400> 30

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 31

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer1 for VH
 region

<400> 31

cacgaagcctt gccgccacca tggactggac ctggcgcggtg ttttgcctgc tcgccgtggc 60
 tcctggggcc cacagccagg tgcagctggt gcagtct 97

<210> 32

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:preimer2 for VH
region

<400> 32

tcgctgaagg tacctccaga agccttgcag gagaccttca cggaggaccc aggcttcttc 60
acctcagccc cagactgcac cagctgca 88

<210> 33

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer3 for VH
region

<400> 33

ttctggaggt accttcagcg actatgaaat gcactgggtg cgacaggccc ctggacaagg 60
gcttgagtgg atgggagcta ttcattcagg aagagggtgt act 103

<210> 34

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer4 for VH
region

<400> 34

catgtaggct gtactagtgg attgtccgc ggtaatcgtg actctgccct tgaacttctg 60
attgtaggca gtaccacctc ttcttgatg 90

<210> 35

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer5 for VH
region

- 15/19 -

<400> 35
tccactagta cagcctacat ggagctgagc agcctgagat ctgaggacac ggccgtgtat 60
tactgtgcga gaattactgg gtacttcgat gtcgtg 95

<210> 36
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer6 for VH
region

<400> 36
tcgcggatcc actcacctga ggagacgggtg accgtgggtcc ctgccccca gacatcgaag 60
taccagta 69

<210> 37
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer(1) for
VH region

<400> 37
cacgaagctt gccgccacca tggactggac ctggcgcgtg 40

<210> 38
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer(2) for
VH region

<400> 38
tcgcggatcc actcacctga ggagacgggtg accgtgggtcc 40

<210> 39
<211> 82
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer1 for VL
region

<400> 39

cacgaagcct gccgccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc 60
tacagggtgc cactccgatg tt 82

<210> 40

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer2 for VL
region

<400> 40

aatgctttga gagctcctgc aggagatgga ggccggctgt ccaagggatga cgggcagggga 60
gagtggagac tgagtcacat caacatcgga gtggacacct gt 102

<210> 41

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer3 for VL
region

<400> 41

tgcaggagct ctcaaagcat tgtacatagt aatggaaaca cctatttgga atggtacctg 60
cagaagccag ggcagtcctc acagctcctg atctataaag tttccaaccg att 113

<210> 42

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer4 for VL
region

- 17/19 -

<400> 42

tccgacgtct tcagcttcaa ccctgctgat tttcagtgtg aaatcagtgc ctgacccact 60
gccgctgaat ctgcttgga cccagaaaa tcggttgga actttataga tcag 114

<210> 43

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer5 for VL
region

<400> 43

gttgaagctg aagacgtcgg agtttattac tgctttcaag gttcacatgt tccgctcacg 60
tttg 64

<210> 44

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer6 for VL
region

<400> 44

tcgcggaicc aactgaggaa gcaaagtta aattctactc acgtttgatc tccagcttgg 60
tcccctggcc aaacgtgagc ggaacatgtg 90

<210> 45

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer(1) for
VL region

<400> 45

cacgaagctt gccgccacca tgggatggag ctgtatcatc 40

<210> 46

<211> 40

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer(2) for
VL region

<400> 46
ctcgcggatc caactgagga agcaaagttt aaattctact 40

<210> 47
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
leader sequence of VH region

<400> 47
ttcgaagcct gccgccacca tggaatggag ctggatcttt 40

<210> 48
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for J
region of VH region

<400> 48
gaagatctgg atccactcac ctgaggaaac tgtga 35

<210> 49
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
leader sequence of VL region

<400> 49
cttaagcctg ccgccaccat gaagttgcct gttaggctg 39

<210> 50

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for J
region of VL region

<400> 50

ctagatctgg atccacttac gtttcagctc cagctt

36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09868

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P29/00,
A61P19/02, A61P37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P29/00,
A61P19/02, A61P37/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Kon S. et al., Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences., J.Cell.Biochem., (2002), Vol.84, No.2, pages 420 to 432	1-34, 39-45
A	Jones PT. et al., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse., Nature, (1986), Vol.321, pages 522 to 525	1-34, 39-45
A	Bautista DS. et al., Inhibition of Arg-Gly-Asp(RGD)-mediated cell adhesion to osteopontin by a monoclonal antibody against ospeopontin., J.Biol. Chem., (1994), Vol.269, No.37, p.23280-5	1-34, 39-45

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 December, 2002 (04.12.02)

Date of mailing of the international search report
17 December, 2002 (17.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09868

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 35-38
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 35 to 38 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter not required to be searched by this International Searching Authority.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P29/00, A61P19/02, A61P37/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P29/00, A61P19/02, A61P37/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Kon S et al., Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences., J Cell Biochem., (2002), Vol. 84, No. 2, p. 420-432	1-34, 39-45
A	Jones PT et al., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse., Nature, (1986), Vol. 321, p. 522-p. 525.	1-34, 39-45

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.12.01

国際調査報告の発送日

17.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Bautista DS et al., Inhibition of Arg-Gly-Asp (RGD)-mediated cell adhesion to osteopontin by a monoclonal antibody against osteopontin., J Biol Chem., (1994), Vol. 269, No. 37, p. 23280-5.	1-34, 39-45

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 35-38 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。